
Aus der Klinik für Geburtsmedizin
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Th₁-Zytokine und die Prothrombinase fgl2 in normaler und pathologischer Schwangerschaft

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von
Maike Knackstedt
aus Berlin

Dekane: Prof. Dr. med. J.-W. Dudenhausen
Prof. Dr. med. Martin Paul

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. J.-W. Dudenhausen
2. Prof. Dr. med. habil. H. Donat
3. Prof. Dr. med. G. Schönfelder

Datum der Promotion: 24. September 2004

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	5
Zielsetzung	6
1 Einleitung	7
1.1 Grundlagen der Implantation eines Embryos – Der Beginn einer Schwangerschaft	7
1.1.1 Das Transplantationsmodell	7
1.1.2 Die pathologische Implantation	8
1.2 Immunologische Grundlagen einer Schwangerschaft	11
1.2.1 Das Th ₁ /Th ₂ -Paradigma	11
1.2.2 Die Rolle der Th ₁ -Zytokine in der Schwangerschaft	12
1.3 Folgen der immunologischen Dysbalance in der Schwangerschaft	13
1.3.1 Die Aktivierung des Gerinnungssystems	13
1.3.2 Die Rolle der Apoptose in der Schwangerschaft	15
1.4 Aspekte des Spontanabortes	16
1.4.1 Immunologische Grundlagen des Spontanabortes	16
1.4.2 Zwei Abortmodelle in CBA/J Mäusen: Stress versus IL-12	17
1.5 Immunologische Aspekte der Präeklampsie	19
1.6 Fragestellung	21
2 Material und Methoden	23
2.1 Versuchstiere	23
2.2 Patientinnenkollektiv	23
2.3 Versuchsaufbau der Tierversuche	24
2.4 Abortrate in Prozent	24
2.5 Gewebepräparation	25
2.6 Total-RNA-Extraktion	25
2.7 DNase-Behandlung der RNA-Proben	26
2.8 Reverse Transkription	26
2.9 Qualitative PCR	27
2.10 Die Agaroseelektrophorese	28
2.11 Quantitative PCR	29
2.12 Analyse der Taq-Man-Daten	32
2.13 Präparation von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab (Minipräparation)	33
2.14 Linearisierung der Plasmid-cDNA	34
2.15 Synthese der ³⁵ S-markierten RNA-Sonde	35
2.16 In-situ-Hybridisierung	36
2.17 Immunhistochemie	38
2.18 TUNEL-Färbung	39
2.19 Giemsa-Färbung	40
2.20 Statistische Analyse der Daten	41

3	Ergebnisse	42
3.1	Die Erhöhung der Abortrate durch Stress und durch die Injektion von IL-12 p70	42
3.2	Der Einfluss von Stress auf die mRNA-Expression von abortogenen Zytokinen	43
3.2.1	Der Anstieg von TNF- α mRNA nach Stressexposition	43
3.2.2	Die IFN- γ -Expression nach Stressapplikation	43
3.2.3	Die Beeinflussung der mRNA-Expression von IL-12 durch Stress	44
3.2.4	Das Verhältnis der Abortrate zu der quantitativen Menge an Zytokinen	45
3.3	Das Zytokinprofil nach der Injektion von IL-12	48
3.4	Der Vergleich der Expression von fgl2 mRNA bei Stress und nach Injektion von IL-12	48
3.5	Die Induktion von Apoptose durch Stress und IL-12 im Mausmodell	51
3.6	Die Expression von TNF- α im ersten Trimenon und dritten Trimenon	51
3.7	Die Expression von fgl2 mRNA und fgl2 Protein in humanem Plazentagewebe	54
3.7.1	Das erste Trimenon	54
3.7.2	Das dritte Trimenon	57
3.8	Apoptose in Präeklampsie und Spontanabort	59
4	Diskussion	61
5	Zusammenfassung	72
6	Schriftenverzeichnis	74
7	Anhang	91

Abkürzungsverzeichnis

↑/ ↓/–	Anstieg/ Abfall/ gleichbleibend
ASS	Acetylsalizylsäure
CD	Cluster of Differentiation
DNA	Desoxyribonukleinsäure (A = Acid)
COX	Cyclooxygenase
EGF	Epidermal Growth Factor
fgl2	Fibrinogen-like-Protein 2
HLA	Humanes-Leukozyten-Antigen
HO	Hämoxygenase
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IFN- γ	Interferon-gamma
IL	Interleukin
IRF	Interferon-Regulatory-Factor
LIF	Leucemia-Inhibitory-Factor
LPS	Lipopolysaccharid
MHC	Major-Histocompatibility-Complex
MHV3	Murine Hepatitis-Virus
MIP	Macrophage-Inflammatory-Protein
RNA/ mRNA	(messenger) Ribonukleinsäure (A = Acid)
NK-Zellen/uNK-Zellen	Natural-Killer-Cells/uterine NK-Zellen
NO	Nitric-Oxide
NOS (iNOS)	Nitric-Oxide-Synthase (inducible Nitric-Oxide-Synthase)
OX	Orexin = CD 200
PAI	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor
PCR	Polymerase-Chain-Reaction
PE	Präeklampsie
PMNL	Polymorphonukleare Leukozyten
RT	Reverse Transkriptase
TGF	Transforming-Growth-Factor
Th	T-Helferzelle
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor-alpha
VEGF	Vascular-Endothelial-Growth-Factor

Zielsetzung

Die Zielsetzung dieser Arbeit ist es,

- 1 im Mausmodell mit der Paarungskombination CBA/J-Weibchen und DBA/2J-Männchen die Unterschiede im uterinen Zytokinprofil und die Rolle der Prothrombinase fibrinogen-like-Protein 2 (kurz fgl2) bei Stress-induziertem und inflammatorisch-induziertem Abort zu untersuchen.
- 2 das Zytokinprofil im Zusammenhang mit einer eventuellen Aktivierung des Gerinnungssystems über fgl2 als Prothrombinase in Deziduagewebe von Patientinnen mit normalem Schwangerschaftsverlauf und von Patientinnen im ersten Trimenon mit Abort zu charakterisieren.
- 3 an Plazentagewebe von Patientinnen mit unkompliziertem Schwangerschaftsverlauf und Patientinnen mit Präeklampsie im dritten Trimenon die Expression von Th₁-Zytokinen und von fgl2 zu beschreiben.

1 Einleitung

Die spontane Fehlgeburt ist eine der häufigsten Schwangerschaftskomplikationen beim Menschen. Neben genetischen, endokrinologischen, anatomischen und mikrobiologischen Ursachen für einen Spontanabort gibt es zahlreiche Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen immunologischen Dysbalancen und dem Auftreten eines Abortes (10% der Aborte).

Eine pro-inflammatorische Aktivierung des Immunsystems im ersten Trimester der Schwangerschaft könnte auch im Zusammenhang mit Schwangerschaftskomplikationen des dritten Trimesters stehen, wie z. B. der Präeklampsie. Die Präeklampsie ist eine Schwangerschaftskomplikation, deren Kardinalsymptome Bluthochdruck und renale Dysfunktion (Proteinurie) sind. Die einem Abort beziehungsweise einer Präeklampsie vorangehenden immunologischen Trigger sind Gegenstand wissenschaftlicher Diskussion ebenso wie die Mechanismen, über die das Immunsystem den Abort oder die Präeklampsie auslöst. Um frühzeitig intervenieren oder zumindest aber symptomatisch therapieren zu können, ist es notwendig, die Abläufe eines Abortes und einer Präeklampsie zu kennen.

1.1 Grundlagen der Implantation eines Embryos – Der Beginn einer Schwangerschaft

1.1.1 Das Transplantationsmodell

In dem von Medawar 1953 postulierten Transplantationsmodell dominiert die Vorstellung, der Embryo, entstanden durch die Vereinigung gleicher Teile mütterlichen sowie väterlichen Erbgutes, sei ein „semi-allogenes Transplantat“ im Uterus der Mutter (Medawar 1953; Loke *et al.*, 1998). Der Implantationsprozess des Embryos im Uterus der Mutter stelle daher einen erfolgreichen Transplantationsvorgang dar. Der unmittelbare Kontakt zwischen Embryo und Mutter wird durch eine Zellummantelung des Embryos bestehend aus den Trophoblastzellen vermittelt. Das mütterliche Blut (und folglich auch das mütterliche Immunsystem) steht demnach in keinem direkten Kontakt zu dem Embryo, sondern nur zu seiner Ummantelung, den Trophoblasten. Diese Ummantelung wird häufig mit einem Kokon verglichen, in dem der Embryo, sicher eingehüllt und geschützt, optimal heranwachsen kann. Anfang der neunziger Jahre wurde von Kovats *et al.* (1990) entdeckt, dass der Trophoblast keine klassischen Transplantationsoberflächenproteine, die „major histocompatibility complex“-Moleküle (im weiteren MHC-Moleküle), exprimiert. Der Trophoblast besitzt eine Sonderklasse dieser MHC-Moleküle: oligomorphe Antigene wie

HLA-G (Human Leukocyte Antigen = MHC), HLA-E und HLA-F anstatt der klassischen HLA-A, -B, -C-Moleküle (Kovats *et al.*, 1990; Verma *et al.*, 1997; Loke *et al.*, 1997). Die Expression von HLA-G ist für den Erfolg einer Schwangerschaft von großer Bedeutung, da HLA-G zum einen die Aktivität von CD56 positiven NK-Zellen bzw. CD 3 positiven T-Zellen (Le Gal *et al.*, 1999) und zum anderen die Sekretion von TNF- α , einem Th₁-Zytokin (1.2.2) durch NK-Zellen und T-Zellen hemmt (Maejima *et al.*, 1997). Das völlige Fehlen dieser immunsupprimierenden Funktion durch das HLA-G auf der Zelloberfläche des Trophoblasten würde in der Abstoßung des Embryos als „non-self“ münden (missing-self Hypothese von Ljunggren *et al.*, 1990). Die Malimplantation (1.1.2) des Embryos bei Präeklampsie kann möglicherweise auch auf die verminderte HLA-G-Expression des Trophoblasten zurückgeführt werden. Diese Sonderklasse der MHC-Moleküle ist also ein genialer „immunologischer Trick“, dessentwegen die Trophoblasten trotz semi-allogenen Ursprunges *kontrolliert invasiv* in mütterliches Gewebe vordringen können. Von immunologischer Relevanz für das Gelingen dieser „Transplantation“ sind auch die im ersten Trimenon anwesenden immunkompetenten Zellen: T-Zellen, Makrophagen und NK-Zellen sowie deren Botenstoffe, die Zytokine (Clark *et al.*, 1978; Noun *et al.*, 1989; Arck *et al.*, 1997; Guimond *et al.*, 1997). Um die patho-immunologische Konstellation des Spontanabortes und der Präeklampsie untersuchen zu können, müssen zunächst die pathophysiologischen Mechanismen der Malimplantation bei einem Abort beziehungsweise einer Präeklampsie genauer betrachtet werden.

1.1.2 Die pathologische Implantation

Eine gemeinsame und häufig auftretende Pathologie in Spontanaborten und Präeklampsie ist die unzureichende Invasion der Trophoblasten in maternales Gewebe und Gefäße. Von besonderer Relevanz für den Verlauf einer Schwangerschaft ist der Erfolg der Invasion der Trophoblasten und somit der Implantation des Embryos. Bei der Invasion der Trophoblasten unterliegt die dem Embryo zugewandte Seite des Uterus, das mütterliche Endometrium, einer Umwandlung – Dezidualisation – wodurch sich der Uterus den Bedürfnissen des Embryos optimal anpasst. Die Implantation zeigt einen zweiphasigen Verlauf: In der ersten Phase, die im ersten Trimenon der Schwangerschaft stattfindet, invadieren die Syncytiotrophoblastzellen das mütterliche Endometrium (Dezidua basalis) und eröffnen dort maternale Spiralarterien, ohne größere Blutungen oder starke Gerinnungsaktivität hervorzurufen (Sheppard *et al.*, 1974a; Sheppard *et al.*, 1974b). Nach der Eröffnung der Gefäße fusionieren die Syncytiotrophoblastzellen und formieren ein

Syncytium, das mit dem maternalen Blut in Kontakt steht und einen intraluminalen Pfropf darstellt. Des Weiteren invadieren die Cytotrophoblastzellen die Media der Spiralarterien, um so den Druck und das fließende Blutvolumen in den Gefäßen zu reduzieren. Währenddessen bilden die intraluminalen Trophoblasten eine feste Verankerung mit der dezidualen Matrix (Khong *et al.*, 1986; Pijnenborg *et al.*, 1991; Pijnenborg *et al.*, 1996). Wenn sich diese intraluminalen Pfropfen langsam aufgelöst haben, dringen die Trophoblasten weiter in die arterielle Gefäßwand ein, ersetzen das Endothel und zerstören dabei gleichzeitig die Media, wodurch diese arteriellen Druckgefäße mit hohem Widerstand zu arteriellen Gefäßen mit großem Durchmesser und geringem Druck umgewandelt werden. Scheitert diese erste Welle der Invasion, könnte ein Abort eines chromosomal unauffälligen Embryos erfolgen (Khong *et al.*, 1987).

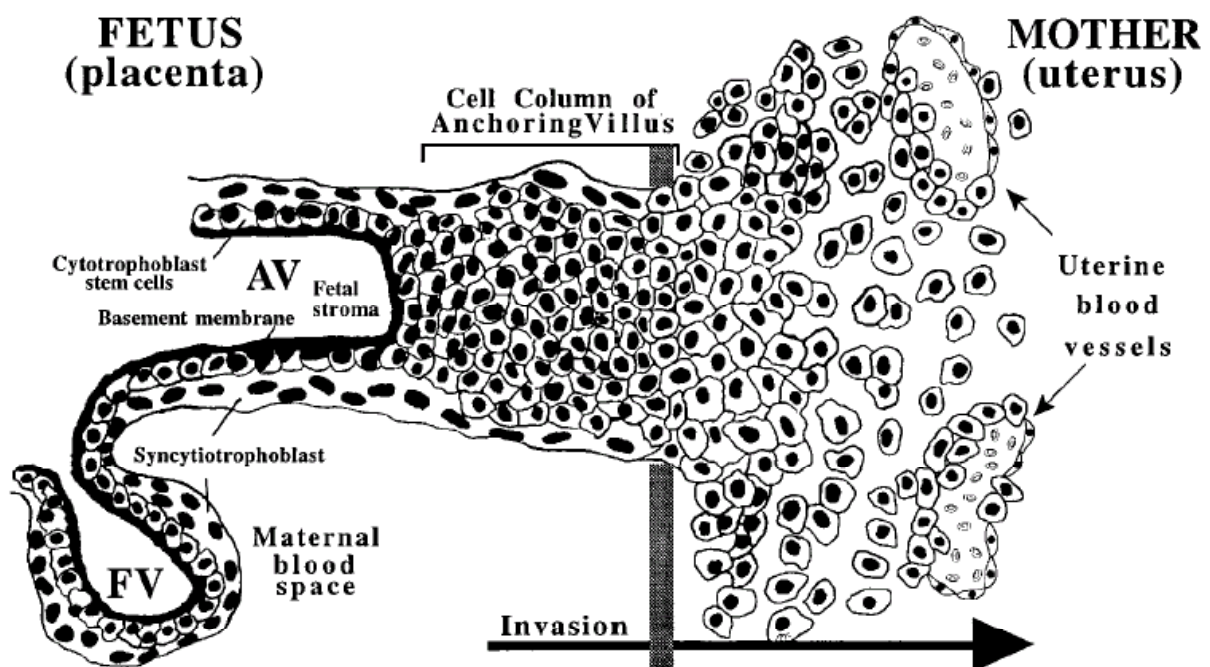


Abbildung 1: **Trophoblasteninvasion während der Frühschwangerschaft**

Cytotrophoblasten invadieren in mütterliches Gewebe, insbesondere in mütterliche Gefäße. Dort kleiden sie die Gefäßwand luminal aus, wobei sie das Integrinmuster der mütterlichen Endothelzellen imitieren.
(modifiziert nach Zhou et al. 1997)

In dem frühen zweiten Trimester findet die zweite Welle der Implantation statt, bei der die Trophoblasten tiefer in das mütterliche Gewebe invadieren – in das Myometrium (Sheppard *et al.*, 1976; Khong *et al.*, 1986). Ziel dieser zweiten Invasionswelle der Trophoblasten sind die myometrialen Spiralarterien. Die Invasion bewirkt eine Dilatation der Spiralarterien und ermöglicht somit eine ausreichende Blutzufuhr, ohne eine gleichzeitige Erhöhung des systemischen Blutdruckes im dritten Trimester zu verursachen. In dieser Phase der Schwangerschaft nimmt der

Embryo primär an Größe zu und hat daher einen stark erhöhten Bedarf an Nährstoffen. Eine unzulängliche zweite Invasion könnte zu intrauterinen Wachstumsretardierungen führen. Ein möglicher Kompensationsmechanismus einer unzureichenden zweiten Invasion wäre die Erhöhung des maternalen Blutdrucks, gefördert durch die Ausschüttung von Vasopressoren wie zum Beispiel Endothelin. Pathophysiologisch führt die unzulängliche Versorgung des Feten durch eine mangelnde Perfusion der Plazenta zu hypoxischen Trophoblasten, die daraufhin Membranvesikel sezernieren, die toxische und vasopressorische Substanzen gespeichert haben. Diese Ausschüttung vasopressorischer Substanzen als Reaktion auf plazentare Hypoxie führt zu einem der Kardinalsymptome der Präeklampsie: dem schwangerschaftsinduzierten Bluthochdruck (Johansen *et al.*, 1999).

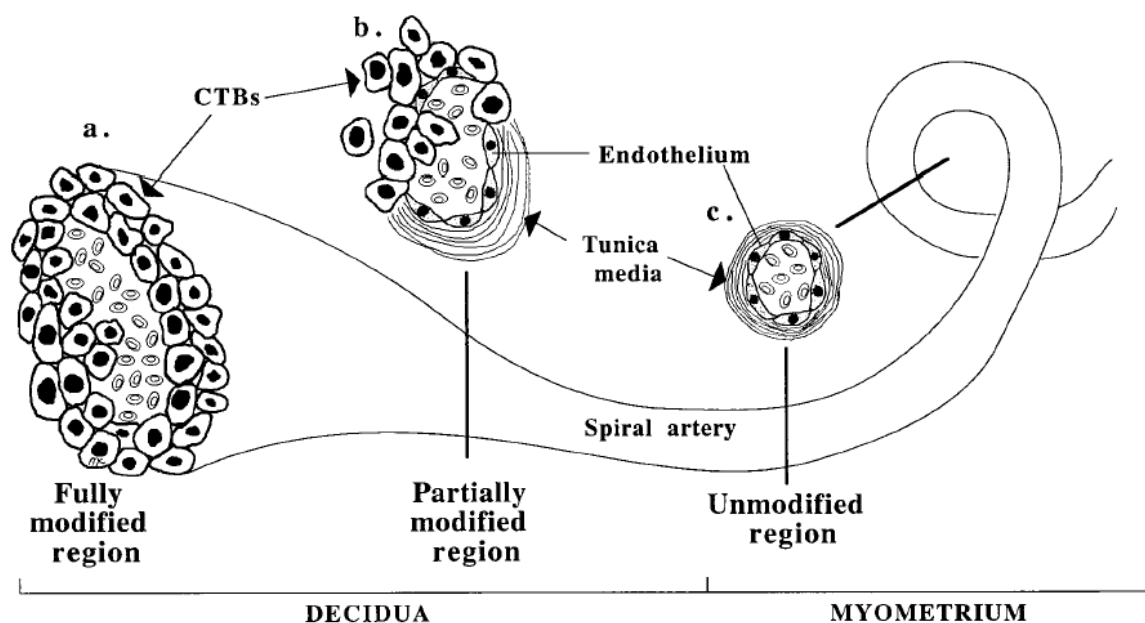


Abbildung 2: **Uteroplazentare Zirkulation**

Dargestellt ist die Umwandlung der maternalen Spiralarterien von Hochwiderstandsgefäßen in Gefäße mit niedrigem Widerstand bei weitem Gefäßdurchmesser. Diese Umwandlung wird durch die eingewanderten Trophoblasten, die das Integrinprofil der mütterlichen Endothelzellen imitieren, gesteuert (siehe auch Abbildung 1).
(modifiziert nach Zhou, 1997)

Eine unzulängliche Invasion mütterlicher Gefäße durch die Trophoblasten gefährdet die optimale Versorgung des Embryo/Fötus und kann somit zur Hypoxie und anderen Fehlregulationen führen, die einerseits in der Frühschwangerschaft einen Abort oder in der Spätschwangerschaft die Entwicklung einer Präeklampsie auslösen können.

1.2 Immunologische Grundlagen einer Schwangerschaft

1.2.1 Das Th₁/Th₂-Paradigma

Bei der Differenzierung von T-Zellen gibt es zwei mögliche Profile. Durch die Einwirkung unterschiedlicher Zytokine kann sich aus der T-Helferzelle eine Th₁-Zelle oder eine Th₂-Zelle entwickeln. Die Th₁-Entwicklung wird durch die Anwesenheit von IL-12 und IFN- γ gefördert, wohingegen die Zytokine IL-4 und IL-5 eine Th₂-Entwicklung begünstigen. Die Th₁-Zelle zeichnet sich durch die Entwicklung und Förderung eines inflammatorischen Milieus aus, unter anderem durch die Aktivierung und Rekrutierung von Makrophagen und anderen immunkompetenten Zellen, welche inflammatorische Zytokine sezernieren (z.B. IFN- γ , IL-3 etc.). Die Th₂-Zelle aktiviert B-Lymphozyten, Mastzellen und eosinophile Granulozyten, wodurch die Produktion von Antikörpern angeregt wird. Charakteristische Zytokine einer Th₂-Immunantwort sind IL-4 und IL-10 (Roitt *et al.*, 1998).

Seit Mitte der neunziger Jahre wird Schwangerschaft als ein Th₂-Phänomen angesehen (Lin *et al.*, 1993). Diese Hypothese beruht unter anderem auf der Beobachtung, dass trächtige C57BL/6-Mäuse, die gleichzeitig mit dem *Leishmania major*-Erreger infiziert waren, durch eine Th₁-Immunantwort zwar die Infektion erfolgreich bekämpfen konnten, diese erfolgreiche Ausheilung der *Leishmania major*-Infektion aber mit einem Abort einherging. Trugen die Tiere aus bedingte diese Immunkonstellation (Th₂-Immunantwort) die Persistenz der L.*major*-Infektion (Krishnan *et al.*, 1996a; Krishnan *et al.*, 1996b). Besonders der Spontanabort als auch die Präeklampsie scheinen zwei Schwangerschaftskomplikationen zu sein, für die eine Th₁-Dominanz charakteristisch ist (Clark *et al.*, 1994; Hill *et al.*, 1995; Piccini *et al.*, 1996; Jones *et al.*, 1997; Raghupathy *et al.*, 1999; Saito *et al.*, 1999). Zu den Th₁-Zytokinen zählen IFN- γ , TNF- α , IL-1 und IL-2 (Roitt *et al.*, 1998). Als ein schwangerschaftsprotektives Zytokin gilt TGF- β_2 , weil es immunsupprimierende Eigenschaften besitzt (Arck *et al.*, 1995; Clark *et al.*, 1999). Durch neuere Daten wird die traditionelle Vorstellung von den Th₁-Zytokinen als generell schwangerschaftsgefährdend aufgeweicht und es scheint, dass die generelle Kategorisierung der Th₁-Zytokine als abortogen in einigen Aspekten eine zu starke Simplifizierung darstellt (Chaouat *et al.*, 2002).

Entscheidend ist aber die Erkenntnis, dass viele Schwangerschaftskomplikationen mit einem Überwiegen der Th₁-Zytokine in Zusammenhang stehen. Die genauere Untersuchung der Rolle der Zytokine in der Schwangerschaft ist somit weiterhin Gegenstand wissenschaftlicher Diskussion.

1.2.2 Die Rolle der Th₁-Zytokine in der Schwangerschaft

Wenn man sich die Th₂>Th₁-Hypothese für den Erfolg einer Schwangerschaft vor Augen führt, so ist die Immunkonstellation, die eine Th₁-Immunantwort auslöst, von besonderem Interesse. Als einer der potentesten Trigger einer Th₁-Immunantwort wird das Interleukin 12 diskutiert, unter anderem durch die IL-12 vermittelte Produktion großer Mengen an IFN- γ (Seder *et al.*, 1993; Trichnieri *et al.*, 1996; Fantuzzi *et al.*, 1999). Hauptsächliche Quelle von Interleukin 12 sind die antigenpräsentierenden Zellen, kurz APZ. Deren IL-12-Produktion kann zum einen abhängig von T-Zellen und zum anderen unabhängig von T-Zellen geschehen. Es ist gezeigt worden, dass die Expression von IL-12 mRNA in der Dezidua von trächtigen Mäusen in einem engen Zusammenhang mit der Expression von IFN- γ mRNA steht (Haddad *et al.*, 1997). Diese Zytokinkonstellation – IL-12 \uparrow , IFN- γ \uparrow – führt zur Aktivierung von Makrophagen mit darauffolgender Expression von TNF- α mRNA und iNOS mRNA, wodurch ein embryotoxisches Milieu entsteht (Haddad *et al.*, 1997). IFN- γ scheint in der Schwangerschaft eine ambivalente Rolle zu spielen: Zum einen können NK-Zellen IFN- γ sezernieren, wodurch Makrophagen stimuliert werden, welche als wichtige Quelle des aggressiv embryotoxischen NO angesehen werden (Haddad *et al.*, 1997; Athanassakis *et al.*, 1999). Des Weiteren scheint IFN- γ wichtig in der Vermittlung von LPS abhängigen Resorptionen in Mäusen zu sein, da eine LPS-Stimulation in IFN- γ defizienten, trächtigen Mäusen keine Resorptionen auszulösen vermochte (Haddad *et al.*, 1997). In humanen Studien konnte IFN- γ in uterinen Zellen, insbesondere in polymorphonuklearen Neutrophilen, beobachtet werden und trat vermehrt nach Stimulation durch IL-12, LPS und TNF- α auf (Yeaman *et al.*, 1998). Zum anderen scheint IFN- γ aber auch eine bedeutende Funktionen für den erfolgreichen Verlauf einer Schwangerschaft zu haben: Neuere Daten im Tierrmodell zeigen, dass uNK-Zellen, eine hochspezialisierte Lymphozytensubpopulation, einen entscheidenden Beitrag in der schwangerschaftsassozierten Modifikation uteriner Gefäße für die adäquate Dezidualisation leisten (Ahkar *et al.*, 2000). Diese schwangerschaftsadaptive Modifikation wird durch eine von IFN- γ gesteuerte Genregulation vermittelt und nimmt Einfluss auf das Wachstum der Plazenta. Auch bei humanen CD56 Zellen (NK-Zellen) konnte eine ähnliche Funktion beschrieben werden (Croy *et al.*, 2000).

Entscheidende Impulse zur Charakterisierung der Wirkung von Th₁-Zytokinen auf den Verlauf einer Schwangerschaft gaben Versuche im Mausmodell (in der Paarungskombination CBA/J x DBA/2J), bei denen eine simultane Injektion von TNF- α und IFN- γ eine Abortrate von bis zu

80% auslösen konnte (Clark *et al.*, 1998). Aufgrund der Daten dieses und folgender Versuche wurde postuliert, dass TNF- α und IFN- γ in synergistischer Funktion maternales Endothel stimulieren, große Mengen einer Prothrombinase das fibrinogen-like-Protein 2 (fgl2) zu sezernieren. Diese Gerinnungsaktivierung führt zum einen zur Fibrinablagerung, zum anderen wird durch fgl2 die Produktion von IL-8 (in der Maus: MIP-2) angeregt, welches wiederum polymorphonukleare Leukozyten (PMNL) anlockt (Clark *et al.*, 1998; Clark *et al.*, 1999).

Weitere zytokinvermittelte Effekte ergeben sich durch die übereinstimmende Strukturhomologie des TNF- α -Rezeptors mit dem Fas-Rezeptor. Fas ist ein Protein, welches den selbstprogrammierten Zelltod, die Apoptose, anstoßen kann (Roitt *et al.*, 1998). Durch die Rezeptorhomologie vom TNF- α -Rezeptor und dem Fas-Liganden wird vermutet, dass TNF- α selbst in der Lage ist, Apoptose zu induzieren (Roitt *et al.*, 1998.).

In dem vorangegangenen Abschnitt wurden zwei Folgen der Ausschüttung und Anwesenheit von Th₁-Zytokinen während der Schwangerschaft vorgestellt: Aktivierung von Gerinnung und selbstprogrammierter Zelltod. Im nächsten Abschnitt (1.3) werden die Zusammenhänge zwischen aktivierter Gerinnung in der Schwangerschaft und der Pathogenese von Schwangerschaftskomplikationen sowie die Rolle der Apoptose in der Schwangerschaft näher beleuchtet.

1.3 Folgen der immunologischen Dysbalance in der Schwangerschaft

1.3.1 Die Aktivierung des Gerinnungssystems

Es existiert zunehmend die Vermutung, dass die Aktivierung von Blutgerinnung während der Schwangerschaft eine wichtige Rolle in der Pathogenese vieler mit der Schwangerschaft assoziierter Erkrankungen spielt. Habituelle Fehlgeburten sowie Präeklampsie in humaner Schwangerschaft scheinen mit einer verstärkten Gerinnungsneigung zusammenzuhängen. Es ist gezeigt worden, dass habituelle Fehlgeburten ähnlich wie der frühe Beginn einer Präeklampsie häufig in Zusammenhang mit einem Protein S-Mangel, Protein C-Resistenz, Hyperhomocysteinämie und Antikardiolipin-Antikörpern stehen (Dekker *et al.*, 1995). Diese hämatologischen Erkrankungen könnten aggressiver zur Manifestation von Schwangerschaftspathologien führen als Folge einer gestörten Interaktion zwischen Endothelzellen, Thrombozyten, Leukozyten und Plasmakoagulation. Die zugrunde liegende Fehlregulation im Gerinnungssystem könnte unter anderem durch eine Immunmimbalace verursacht sein. In diesen Schwangerschaften dominiert eine Th₁-Immunantwort. Der Einfluss von Zytokinen auf thromboinflammatorische Prozesse hat seit Ende

der neunziger Jahre große Aufmerksamkeit in der Reproduktionsimmunologie generiert. In einem Tiermodell konnte bei einer basalen Abortrate von 10-15% durch die zeitgleiche Injektion von IFN- γ und TNF- α auf bis zu 80% erhöht werden. Gleichzeitig wurde ein Anstieg der Prothrombinase fgl2 beobachtet. Eine die Zytokin-Injektion begleitende Applikation eines Anti-fgl2-Antikörpers führte zu einer Reduktion der Abortrate auf fast 15%. Die pharmakologische Therapie der zytokininduzierten Gerinnung durch die Applikation von Heparin oder Hirudin reduzierte die Abortrate drastisch (Clark *et al.*, 1998). Fgl2 wurde durch funktionelles Klonen der cDNA aus Peritoneal-Makrophagen von Mäusen, deren Leber mit einem murinen Hepatitis-Virus (MHV3) infiziert worden war, identifiziert (Ding *et al.*, 1998a; Ding *et al.*, 1998b). Fgl2 ist auf dem langen Arm des humanen Chromosom 7 und auf der proximalen Region des murinen Chromosom 5 lokalisiert worden (Qureshi *et al.*, 1995). In der Maus wird fgl2 von Makrophagen und Endothelzellen in einer induzierbaren, membran-assoziierten Form exprimiert. T-Zellen scheinen eine immunmodulatorische, lösliche Form von fgl2 zu produzieren, Fibroleukin, welches keine Prothrombinase-Aktivität besitzt. Fgl2 konnte ebenso in humaner, mit Hepatitisviren infizierter Leber detektiert werden (Levy *et al.*, 2000). Im Mausmodell ist die Hypothese aufgestellt worden, dass die beiden Th₁-Zytokine, IFN- γ und TNF- α , wenn injiziert, auf mütterliche Endothelzellen einwirken und dort die Produktion und Expression von fgl2 fördern. Beide Th₁-Zytokine sind erforderlich, um die Abortrate signifikant zu erhöhen. Wenn fgl2 von den maternalen Endothelzellen exprimiert wird, fungiert es als direkte Prothrombinase und wandelt Prothrombin in Thrombin um. Dieser Vorgang führt zu einem zur Gerinnung und erhöhter Bildung von Fibrin, zum anderen zur Aktivierung der Endothelzellen und zur erhöhten Produktion von IL-8 (in der Maus MIP-2). Die Anwesenheit von IL-8 wirkt chemotaktisch auf polymorphonukleare Leukozyten, die den Untergang von Plazentagewebe provozieren. Die entscheidende Rolle von PMNLs in diesem Vorgang wurde dadurch belegt, dass die Inaktivierung der PMNL durch Injektion eines Antikörpers die Abortrate auf nahezu normaler Werte senken konnte (Clark *et al.*, 1998; Clark *et al.*, 1999).

Inflammatorische Prozesse in der Schwangerschaft können über fgl2-abhängige Prozesse zu einer verstärkten Gerinnungsneigung führen, die eine abortogene Kaskade auslösen kann. Versuche zeigten, dass durch TNF- α und IFN- γ keine Aborte in Weibchen ausgelöst wurden, die kein Responder-Gen für IFN- γ aufwiesen (IRF-1 knockout Mäuse) (Matsuyama *et al.*, 1993; Kamijo *et al.*, 1994) und damit nicht auf durch IFN- γ vermittelte Prozesse reagieren konnten. Die Embryonen aber besaßen bei dieser genomischen Konstellation den IRF-1^{+/-}, also den heterozygoten, Phänotyp. Somit waren die Trophoblasten IRF-1 positiv und demnach empfänglich für Apoptose (Clark *et al.*, 1998). Diese Daten deuten daraufhin, dass nicht nur der Trophoblast ein

wichtiges Zielorgan im Abortgeschehen ist, sondern ebenfalls mütterliches Gewebe. Das mütterliche Gefäßsystem, insbesondere das Endothel, könnte folglich bei Schwangerschaftskomplikationen von großer Bedeutung sein. Diese Schlussfolgerung unterstützt die Hypothese, dass die vom mütterlichen Endothel exprimierte Prothrombinase fgl2 ein zentrales Glied in der Verkettung von inflammatorischen Ereignissen und abortogenen Stimuli darstellt.

1.3.2 Die Rolle der Apoptose in der Schwangerschaft

Apoptose ist eine Form des Zelltodes, der überflüssige oder geschädigte Zellen beseitigt. Dieser Prozess wird von verschiedenen Signalketten gesteuert, welche die aktive Antwort der Zelle auf externe Wachstumsreize, Überlebens- oder Todessignale übermitteln. Definierend für die Apoptose sind die charakteristisch morphologischen Zellveränderungen, insbesondere die Fragmentation der Zell-DNA, die mittels bestimmter Techniken detektiert werden kann (Apodetect, Qbiogene). Während der gesamten Schwangerschaft ist eine Apoptoseaktivität in der Plazenta nachweisbar, wobei im Verlauf der Schwangerschaft diese Aktivität zunimmt. So ist die Aktivität im zweiten Trimenon signifikant gegenüber dem ersten Trimenon und im dritten Trimenon signifikant gegenüber dem zweiten Trimenon erhöht (Halperin *et al.*, 2000). *In vitro*-Daten von Yui *et al.* zeigen, dass Th₁-Zytokine, insbesondere TNF- α , in der Lage sind, Apoptose in Cytotrophoblasten der Zotten zu induzieren (Yui *et al.*, 1994). Dieser Effekt wird durch die Anwesenheit von IFN- γ weiter verstärkt. In folgenden Versuchen zeigt Yui *et al.*, dass diese Apoptose-induzierende Wirkung von TNF- α allein über den p55-Rezeptor vermittelt wird (Yui *et al.*, 1996). Im Mausmodell konnte eine erhöhte Apoptoseaktivität im Uterus erzeugt werden, wenn die Mäuse am Tag 9,5 oder Tag 12,5 mit LPS (Endotoxin) stimuliert wurden (Savion *et al.*, 2002). Auch gerinnungsaktive Substanzen wie Thromboxan A(2) scheinen fähig, Apoptose zu induzieren, denn Thromboxan A(2) konnte die Differenzierung von Trophoblasten einschränken und die Apoptoseaktivität in humanen Trophoblasten steigern (Yusuf *et al.*, 2001). Bei der Entwicklung eines pathologischen Schwangerschaftsverlaufes kann die HLA-G-Expression der Trophoblasten verändert sein, womit gleichzeitig das Profil dezidualer NK-Zellen durch Apoptose moduliert wird (Emmer *et al.*, 2002). Des Weiteren konnte das Auftreten von Spontanaborten mit einer verstärkten Apoptoseinzidenz in humanen Syncytiotrophoblasten in Zusammenhang gebracht werden (Kokawa *et al.*, 1998). Wie in Kapitel 1.1 dargestellt, lässt sich eine Kausalbeziehung zwischen einer unvollständigen Invasion der Trophoblasten und der Pathogenese der Präeklampsie vermuten. Ebenso ist eine funktionierende Kontrolle des invasiven Wachstums der

Trophoblasten von Bedeutung. Vermutet wird, dass Makrophagen über Apoptose von extrazotären Trophoblasten Einfluss auf die Tiefe der Invasion der Trophoblasten nehmen. Es konnte gezeigt werden, dass im Falle einer Präeklampsie die Makrophagen das Wachstum und die Invasion von extrazotären Trophoblasten durch TNF- α induzierte Apoptose verstärkt regulieren (Reister *et al.*, 2001). Diese Beobachtung stimmt mit Ergebnissen früherer Studien überein, wonach in Präeklampsie gerade die invasiven Trophoblasten vermehrt apoptotisch sind (DiFrederico *et al.*, 1999). Einen wichtigen protektiven Mechanismus gegenüber Apoptose in vivo scheinen epidermale Wachstumsfaktoren auszuüben (EGF) (Levy *et al.*, 2000). Insbesondere durch Hypoxie vermittelte Apoptoseinduktion und Zelldifferenzierungshemmung, wie sie in der Pathogenese der Präeklampsie eine entscheidende Rolle spielen, werden durch die Expression von EGF vermindert (Levy *et al.*, 2000). Dementsprechend konnte in Präeklampsie-Plazenten eine drastisch verminderte Aktivität von EGF beobachtet werden (Leach *et al.*, 2002).

1.4 Aspekte des Spontanabortes

1.4.1 Immunologische Grundlagen des Spontanabortes

Wie in Kapitel 1.2 beschrieben, ist durch neuere Daten eine wissenschaftliche Kontroverse über das Th₁/Th₂-Modell entstanden. Das klassische Th₁/Th₂-Modell basiert auf folgenden Erkenntnissen:

Th₂-Zytokine werden sowohl von immunkompetenten Zellen als auch von Plazenta- und Dezi-duazellen produziert. Die Beobachtung, dass die Th₂-Zytokine IL-4, IL-10 und IL-3 in normaler muriner und humaner Schwangerschaft in hohen Mengen exprimiert werden (Lin H *et al.*, 1993; Piccini *et al.*, 1998; Arck *et al.*, 1999) und ihre Injektion einen Abort in Mäusen verhindern kann (Chaouat *et al.*, 1995), haben das Modell der Schwangerschaft als Th₂- Phänomen unterstützt. Im Gegensatz dazu konnten bei der Untersuchung von Aborten hohe Menge an Th₁-Zytokinen wie TNF- α , IFN- γ und IL-1 beobachtet werden (Krishnan L, 1996; Raghupathy *et al.*, 1997; Raghupathy *et al.*, 1999; Joachim *et al.*, 2001). Ebenso konnte die Injektion von Th₁-Zytokinen die Abortrate drastisch steigern (Chaouat *et al.*, 1990; Clark *et al.*, 1997). Neutralisierte man mittels Antikörperapplikation die Wirkung von TNF- α und IL-1, so reduzierte sich die Abortrate deutlich (Arck *et al.*, 1997). Die wissenschaftliche Diskussion entstand vor dem Hintergrund der engen Grenzen bei der Kategorisierung der Zytokine und ihrer Funktionen im Abortgeschehen, wodurch eine sinnvolle Interpretation neuerer Daten nicht möglich war: Der Leukämie-

Inhibitions Faktor, kurz LIF, kann sowohl pro-inflammatorische als auch anti-inflammatorische Wirkung haben (Gadiant *et al.*, 1999): Auf der einen Seite wirkt LIF positiv unterstützend bei der Implantation von Mausembryonen (Stewart *et al.*, 1992; Piccini *et al.*, 1998; Cai *et al.*, 2000). Auf der anderen Seite scheinen verminderte Mengen an LIF in einem Zusammenhang mit besseren Chancen auf einen Erfolg bei einer In-vitro-Fertilisation zu stehen (Ledee-Bataille *et al.*, 2002). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass sowohl IFN- γ als auch LIF in der Lage sind, die Expression von iNOS mRNA in humanen Syncytiotrophoblasten zu steigern (Hambart-soumian *et al.*, 2001). Eine andere Studie belegt, dass IL-18, ein kürzlich erstmalig beschriebenes Th₁-Zytokin, in einer murinen Paarungskombination mit einer hohen Anzahl an Aborten geringer exprimiert wird als in einer Paarungskombination mit einem geringen Prozentsatz an Aborten (Chaouat *et al.*, 2001). Dem gegenüber steht die Erkenntnis, dass IL-18 in Synergie mit IL-12 im Mausmodell und mit großer Wahrscheinlichkeit im humanen Modell eine abortogene Wirkung gezeigt hat (Ida *et al.*, 2000; Tokmadzic *et al.*, 2002). Neben diesen Daten, die zeigen, dass Th₁-Zytokine durchaus bei einer erfolgreichen Implantation präsent oder sogar entscheidend sein können, liegen weitere Daten vor, die zumindest ein Ausbleiben des erwarteten Th₁-Zytokinanstieges bei Aborten belegen. Eine dieser Studien führt an, dass kein Unterschied in der dezidualen IFN- γ -Produktion im Spontanabort im Vergleich zu einem normalen Schwangerschaftsverlauf messbar gewesen sei (Palfi *et al.*, 1999; Razaeei *et al.*, 2002). Zu gegensätzlichen Ergebnissen kommen andere Veröffentlichungen, die einen deutlichen Anstieg von IFN- γ im Spontanabort berichten (Hill *et al.*, 1995; Marzi *et al.*, 1996; Vives *et al.*, 1999). Bei Präeklampsie scheint es einen lokalen Anstieg von IFN- γ in der Plazenta zugeben, wobei ein systemischer Anstieg nicht beobachtbar gewesen ist (Daniel *et al.*, 1998; Munno *et al.*, 1999; Wilczynsik *et al.*, 2002). Neuerdings wird eine genetische Prädisposition für eine Th₁-oder eine Th₂-Immunantwort während der Schwangerschaft diskutiert und zur Erklärung von habitueller Abortneigung herangezogen (Reid *et al.*, 2001; Beak *et al.*, 2002).

1.4.2 Zwei Abortmodelle in CBA/J Mäusen: Stress versus IL-12

Es gibt viele Möglichkeiten, einen Abort im Mausmodell zu induzieren. In dieser Arbeit geht es insbesondere darum, ob verschiedene Trigger für einen Abort in eine gemeinsame, abortive Kaskade münden oder ob die ausgelösten Aborte über unterschiedliche Mechanismen ablaufen. Insbesondere die provozierten Zytokinkonstellationen und deren Vergleich standen im Vordergrund des Interesses. Das erste Modell beinhaltet einen starken, inflammatorischen Trigger: Für dieses

Modell wurde die Injektion von IL-12 gewählt, weil IL-12 ein Zytokin ist, welches einen starken pro-inflammatorischen Stimulus für das Immunsystem bedeutet (siehe oben). Nach einer IL-12-Injektion würde man eine vermehrte Produktion und Freisetzung von IFN- γ mit konsequenter Aktivierung von Makrophagen erwarten, wodurch weitere Th₁-Zytokine freigesetzt und NK-Zellen aktiviert würden. Es ist beobachtet worden, dass sowohl die Injektion von IL-12 als auch die Exposition von Stress (siehe unten) die Abortrate in Mäusen steigern kann. Gleichzeitig führt die IL-12-Stimulation zu einer verminderten Synthese der Hämoxygenasen HO-1 und HO-2 und somit zu einem verringerten Schutz des Gewebes vor oxidativen Reizen (Zenclussen *et al.*, 2001). Arbeiten im humanen Bereich beschreiben erhöhte Serumspiegel von IL-12 im Spontanabort und bei Präeklampsie (Dudley *et al.*, 1996; Hayakawa *et al.*, 2000; Sakai *et al.*, 2002). Durch eine IL-12-Behandlung von trächtigen Mäusen ließe sich das durch IL-12 provozierte Zytokinmuster bestimmen und gegebenenfalls gegen andere abortive Mechanismen abgrenzen. Daher wurde zur Gegenüberstellung ein Abortmodell gewählt, welches ebenfalls ein Th₁-Zytokinprofil evoziert, welches aber deutlicher TNF- α dominiert ist und gleichzeitig auf Injektionen, Infektionen oder andere unphysiologische Manipulationen verzichtet. Aus diesen Gründen wurde ein etabliertes Mausmodell aus der Psycho-Neuro-Immunologie angewandt. Dieses Modell basiert zum einen auf einer speziellen Paarungskombination und zum anderen auf der Applikation von Stress. Es werden CBA/J-Weibchen mit DBA/2J-Männchen verpaart. Diese Paarungskombination hat eine hohe Fehlgeburtenrate, die zum großen Teil nicht auf chromosomale Aberrationen zurückzuführen ist (Clark *et al.*, 1993). Die Stressexposition der CBA/J- Weibchen am Tag 5,5 der Trächtigkeit erhöht zusätzlich die Abortrate auf physiologische Weise (Arck *et al.*, 1995). Es ist bekannt, dass Stress eine Th₁-Immunantwort fördert und über diese einen Abort auslösen kann (Arck *et al.*, 1995; Arck *et al.*, 1997; Arck *et al.*, 1997). Einige Zellpopulationen scheinen in dieser Interaktion eine besonders gewichtige Stellung einzunehmen wie z.B. $\gamma\delta$ T-Zellen (CD4⁻, CD8⁻), Mastzellen und NK-Zellen (Chaouat *et al.*, 1990; Arck *et al.*, 1995; Markert *et al.*, 1997; Marx *et al.*, 1999; Arck *et al.*, 1999). Es wird vermutet, dass Stress die Nervenfasern zur Sekretion von Neuropeptiden anregt (Chrousos *et al.*, 1998). Das nach Stressexpression sezernierte Neuropeptid Substanz P wirkt aktivierend auf Mastzellen via Rezeptorinteraktion (Bienenstock *et al.*, 1988; Singh *et al.*, 1999; Jessop *et al.*, 2000), wodurch die Mastzellen degranulieren und TNF- α sezernieren können (Stead *et al.*, 1990; Ansel *et al.*, 1993). Es hat sich gezeigt, dass ein Substanz P-Antagonist die durch Stress getriggerte Abortrate deutlich reduzieren kann (Joachim *et al.*, 2001). Dieses Stressmodell ist ebenfalls auf andere Forschungsgebiete der Medizin angewandt worden und hat mehrfach belegt, dass es eine inflammatorische Immunstimulation bewirkt. Insbesondere entzündliche Darmerkrankungen und Haarausfall lassen sich

durch Stress provozieren oder im humanen Modell auf eine erhöhte Stresswahrnehmung zurückführen (Arck *et al.*, 2001; Goldmann, 2002; Niess *et al.*, 2002).

1.5 Immunologische Aspekte der Präeklampsie

Die erfolgreiche Invasion von Trophoblasten gilt als abhängig von bestimmten Integrinen auf der Oberfläche der Trophoblasten, die identisch mit den Integrinen der maternalen Endothelzellen, dem Zielort der Trophoblasteninvasion, sind. Integrine sind Oberflächenmoleküle, die für Zell-Zell-Interaktion und Zell-Matrix-Interaktionen von herausragender Bedeutung sind. Blastocystische Trophoblasten, die für die initiale Invasion während der Implantation verantwortlich sind, exprimieren mehrere Integrine, die an interzelluläre Matrix und an andere Zellen binden wie zum Beispiel $\alpha 6 \beta 4$, $\alpha v \beta 6$, $\alpha 4 \beta 1$ und E-cadherin (negatives invasives Signal). Normalerweise werden $\alpha 6 \beta 4$, $\alpha 4 \beta 1$ und E-cadherin auf den Trophoblasten zum Zeitpunkt der Invasion herunterreguliert, während VE cadherin, $\alpha v \beta 5 \rightarrow 3$, und $\alpha 1 \beta 1 \& 3$ heraufreguliert werden (Zhou *et al.*, 1997a; Zhou *et al.*, 1997b). Das Integrin $\alpha 5 \beta 1$ des Fibronektins vermittelt ein negatives Signal für die Migration der Trophoblasten. Bei Präeklampsie ist der inhibitorische Rezeptor $\alpha 5 \beta 1$ exprimiert; und $\alpha 6 \beta 1$ wird nicht von dem $\alpha 1 \beta 1$ -Integrinmolekül ersetzt, welches ein wichtiges migration-stimulierendes Signal an das Typ I-Kollagen übermittelt. Diese fehlende Transformation des Integrinmusters des Trophoblasten in der Pathogenese der Präeklampsie scheint die Bindung des Trophoblasten an Matrixmoleküle wie Fibronektin, Vitronektin und Kollagen zu beeinflussen (Damsky *et al.*, 1994; Friedmann *et al.*, 1994; Pijnenborg *et al.*, 1996; Zhou *et al.*, 1997a; Zhou *et al.*, 1997b; Dekker *et al.*, 1998; Bowen *et al.*, 2000). Außerdem fehlt ein wichtiges, positives Migrationssignal durch die ausbleibende Umwandlung von $\alpha v \beta 5$ zu $\alpha v \beta 3$. Diese Umwandlung dürfte ein entscheidender Faktor sein, um das negative Migrationssignal – ausgehend vom $\alpha 5 \beta 1$ des Fibronektins – zu überwinden (Damsky *et al.*, 1994). Die ausbleibenden Transformationen der Integrinexpression des Trophoblasten könnten ein Grund für dessen unvollständige Bindung an die Matrix sowie seine unzureichende Migration in der Pathophysiologie der Präeklampsie erklären. Wäre der Ligand, der die Expression für $\alpha 5 \beta 1$ verstärkt, im Überfluss vorhanden, wäre die Invasion und eventuell sogar die Differenzierung des Trophoblasten zu dem gereiften, invasiv tätigen Phänotyp blockiert (Damsky *et al.*, 1994; Friedmann *et al.*, 1994; Pijnenborg *et al.*, 1996; Zhou *et al.*, 1997a; Zhou *et al.*, 1997b; Dekker *et al.*, 1998; Bowen *et al.*, 2000). Unter Berücksichtigung der Daten zu fgl2 könnte man davon ausgehen, dass der zytokinabhängige Anstieg von fgl2 die Invasion der Trophoblasten zu verzögern vermag. Die Bildung und Ablage-

rung von Fibrin wäre möglicherweise solch ein Mechanismus. Ebenso könnte auch ein direkter Effekt von fgl2 auf die Trophoblasten bestehen und eine mögliche Erklärung für die behinderte Invasion der Trophoblasten in Präeklampsie darstellen. Andere Erklärungen für die gestörte invasive Trophoblastenaktivität könnten die erhöhte Präsenz von Inositolphosphoglykanen und die dadurch vermittelte Apoptose sein (Kunjara *et al.*, 2000) oder eine durch einen vermehrten Sauerstoffverbrauch bedingte vaskuläre Veränderung. Eine erhöhte Expression von Adhäsionsrezeptoren oder die Aktivierung von zirkulierenden Leukozyten, die mit Adhäsionsrezeptoren vermehrt interagieren, würden zu einer Herabsetzung der Migrationsaktivität des Trophoblasten in der Präeklampsie führen (Bearchell *et al.*, 1998; Endresen *et al.*, 1998; Sacks *et al.*, 1999). Auffallend ist auch die Beobachtung, dass die Trophoblasten bei einer Präeklampsie das schützende Selbst-Antigen HLA-G vermindert exprimieren und somit eventuell nur unzureichend vor der Aktivität von NK-Zellen abgeschirmt sind (siehe auch 1.1.1).

Die Hypothese, dass fgl2 zu einem negativen Invasionsstimulus beiträgt, verknüpft die oben genannten Beobachtungen mit den Daten, die eine erhöhte inflammatorische Aktivität des Immunsystems in Präeklampsie beschreiben. Gemäß dem Modell der erfolgreichen, komplikationslosen Schwangerschaft als ein Th₂-Phänomen, scheint diese anti-inflammatorische Prägung des Immunsystems in Präeklampsie nicht erfolgreich abzulaufen, so dass ein Th₁-Milieu in präeklampsischer Schwangerschaft vorherrscht (Wegemann *et al.*, 1993; Marzi *et al.*, 1996; Sabahi *et al.*, 1995; Jones *et al.*, 1997; Saito *et al.*, 1999; Clark *et al.*, 1994). Die wiederholte Exposition des maternalen Immunsystems mit paternalen Alloantigenen – wie bei Transfusionen oder während einer erfolgreichen Schwangerschaft (semi-allogene fetale Leukozyten können die Plazentaschranke überwinden) – fördert die Umwandlung des Th₁-Milieus in ein Th₂-Milieu, woraus sich ein geringeres Risiko für eine spontane Fehlgeburt eines chromosomal normalen Embryos sowie eine geringere Prävalenz von Präeklampsie ergibt (Steck *et al.* 1992; Clark, 1994; Arck *et al.*, 1997; Ramhorst *et al.*, 2000). Tatsächlich fördert eine wohl angewandte Immunstimulation in humaner wie auch in muriner Schwangerschaft das Wachstum des Föten und der Plazenta (Chaouat *et al.*, 1990; Mowbray *et al.*, 1991; Clark *et al.*, 1994). Epidemiologisch orientierte humane Studien haben gezeigt, dass ein Partnerwechsel mit folgender Schwangerschaft in einem relativ kurzen Zeitraum (über wenige Monate) mit einem wesentlich erhöhten Risiko des Auftretens von Präeklampsie behaftet ist. Dies scheint auf die ungenügende Auseinandersetzung des maternalen Immunsystems mit den paternalen Alloantigenen im Ejakulat zurückzuführen zu sein. Eine länger bestehende Partnerschaft, in der die Kohabitation nur unter Anwendung von Präservativen stattgefunden hat, ist ebenfalls mit einem erhöhten Risiko einer Präeklampsie assoziiert (Robillard *et al.*, 1994). Bestimmte maternale Th₁-Zytokine haben für sich genommen sicherlich einen

negativen Effekt auf die Migration und Invasion der Trophoblasten (Haimovici *et al.*, 1991). Im Allgemeinen müssten diese Zytokine allerdings extreme Konzentrationen erreichen, um dieses Ausmaß an invasionshemmender Wirkung zu entfalten. Bei solchen Konzentrationen würde wahrscheinlich der toxische Effekt der Zytokine weit mehr ins Gewicht fallen als mögliche negative Migrationssignale. Auch gibt es keine Hinweise, dass die Th₁-Zytokine einen Einfluss auf die Umwandlung der Integrinexpression des Trophoblasten haben. Zugleich fördern Th₁-Zytokine die Expression der Prothrombinase fgl2, welche über Thrombine und Chemokine die Ablagerung von Fibrin fördert (Clark *et al.*, 1998; Clark *et al.*, 1999; Clark *et al.*, 2001). Implantate, welche nicht resorbiert werden, führen im Mausmodell zu kleineren Embryonen. Vielleicht ist dies ein Speziesunterschied, weil Mäuse auf ischämische Implantate nicht mit einer Blutdruckerhöhung reagieren, wie das bei Ratten oder Menschen der Fall ist. Fibrin, wie auch Fibronectin, bindet an Integrine von Trophoblasten und kann somit die Migration hemmen (Damsky *et al.*, 1994). Daher könnte eine Stimulation einer überwiegend Th₁-dominierten Immunantwort durchaus zu einer erhöhten Expression von fgl2 führen, welche dann eine behinderte Invasion von Trophoblasten via negativer Migrationsignale durch Integrine zur Folge haben könnte, wodurch die damit behinderte Implantation der Wegbereiter für die Entwicklung einer Präeklampsie wäre (Knackstedt *et al.*, 2001).

Die unzulängliche Migration der Trophoblasten scheint pathogenetisch die endotheliale Dysfunktion auszulösen. In welchem Zusammenhang das inflammatorische Milieu in der Präeklampsie mit der gleichzeitig beobachtbaren endothelialen Dysfunktion steht, ist nicht ausreichend geklärt.

1.6 Fragestellung

In dieser Arbeit soll die Immunpathologie der Schwangerschaftskomplikationen, Spontanabort und Präeklampsie, untersucht werden. Insbesondere steht die Verknüpfung des immunologischen Profils der Schwangerschaftskomplikation mit einer zytokinabhängigen Gerinnungsaktivität im Vordergrund des Interesses. Zur genaueren Charakterisierung des immunologischen Profils dient der Vergleich eines Stress-immunologisch mit einem inflammatorisch ausgelösten Abort (IL-12-Injektion) im Mausmodell. Als Vergleichsgrundlage werden quantitative mRNA-Messungen von Zytokinen und der Prothrombinase fgl2 herangezogen. Im humanen Modell ist die Proteinexpression der Prothrombinase fgl2 in humaner Plazenta im ersten und im dritten Trimenon von besonderem Interesse. Im Falle der Expression von fgl2 Protein soll die Rolle von fgl2 in den

Schwangerschaftskomplikationen Spontanabort und Präeklampsie und der Zusammenhang zu einer immunologischen Dysbalance untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Sechs bis acht Wochen alte DBA/2J-Männchen und CBA/J-Weibchen wurden von Charles River (Sulzfeld, Deutschland) und alternativ auch vom Jackson Laboratory (Maine, USA) bezogen. Die Tiere wurden in der Tierhaltung des Virchow-Klinikums (Berlin, Deutschland) beziehungsweise der Tierhaltung des Toronto Hospitals (Toronto, Kanada) bei einem Licht-/Dunkelheitszyklus von zwölf Stunden gehalten. Die Tiere erhielten Futter und Wasser *ad libitum*. Zwei Monate alte CBA/J-Weibchen und drei Monate alte DBA/2J-Männchen wurden im Verhältnis 2:1 für die Verpaarung zusammengesetzt. Die Trächtigkeit wurde jeden Tag zur gleichen Zeit durch die Untersuchung auf einen vaginalen Pfropfen kontrolliert. Dieser Tag wurde als Tag 0,5 der Trächtigkeit dokumentiert. Die Genehmigung zur Vornahme der Versuche dieser Arbeit an lebenden Wirbeltieren wurde vom Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit unter Reg 0401/98 erteilt.

2.2 Patientinnenkollektiv

Die aus dem ersten Trimenon stammenden Gewebeproben bestanden aus paraformaldehydfixierten und in Paraffin eingebetteten Deziduaprobe von 14 Patientinnen, die einen Abort erlitten hatten und von sechs Patientinnen mit einer elektiven Terminierung einer normalen Schwangerschaft aus sozialer Indikation. Die Proben wurden routinemäßig von der Pathologie des Virchow-Klinikums (Berlin, Deutschland) gesammelt und freundlicherweise zur Untersuchung auf fgl2, TNF- α und Apoptose zur Verfügung gestellt.

Die aus dem dritten Trimenon stammenden Gewebeproben bestanden aus paraformaldehydfixierten und in Paraffin eingebetteten Plazentaprobe von zwölf normalen Schwangerschaften und zwölf Plazenten von Patientinnen mit einer Präeklampsie. Im Folgenden werden diese als „Präeklampsie-Plazenten“ bezeichnet. Die Plazentaprobe wurden routinemäßig von der Pathologie des Virchow-Klinikums gesammelt und freundlicherweise zur Untersuchung auf fgl2, TNF- α und Apoptose zur Verfügung gestellt. Die Kontrollproben wurden dem Gestationsalter der Präeklampsieproben, 27- 41 Schwangerschaftswochen (SSW), entsprechend ausgewählt. Die Präeklampsieproben wurden nach den Kriterien der Internationalen Gesellschaft zur Untersuchung von Bluthochdruck in der Schwangerschaft (ISSHP) ausgesucht, wobei der diastolische Blutdruck mindestens dreimal 100mmHg und mehr betragen haben und mindestens einmal eine

Proteinurie mit 1g/dl Protein im Urin oder einem +++ Signal auf dem Urinstreifen gemessen worden sein musste.

2.3 Versuchsaufbau der Tierversuche

Es wurden zwei unabhängige Tierversuche durchgeführt. In dem ersten Versuchsaufbau (I) wurden zehn trächtige Weibchen der Kontrollgruppe zugeordnet und elf der trächtigen Weibchen wurde am Tag 5,5 der Trächtigkeit für 24 h einer Lärmquelle (300 Hz, 70 dB, 4 Mal pro Minute in unregelmäßigen Abständen) ausgesetzt. Lärm ist eine anerkannte Methode zur Stress-Applikation bei Nagetieren, insbesondere die CBA/J-Weibchen zeigen sich empfänglich für diese Art des Stresses (Arck *et al.*, 1995; Arck *et al.*, 1997; Arck *et al.*, 1997). Am Tag 13,5 wurden die Weibchen getötet und die Uteri entnommen. In einem weiteren Versuchsaufbau (II) wurden fünf der trächtigen Weibchen einer Kontrollgruppe zugeordnet und sieben der trächtigen Weibchen erhielten am Tag 5,5; 6,5; 7,5 und 8,5 der Trächtigkeit anstatt Stress eine Injektion von rekombinanten, murinen IL-12 p70 Protein (R&D System, Deutschland). Die Injektion erfolgte intraperitoneal mit 100ng des IL-12 für vier Tage zwischen 8:00 und 10:00 Uhr (Fantuzzi *et al.*, 1999; Zenclussen *et al.*, 2002). Alle Kontrollgruppen erhielten keinerlei Behandlung; auch auf die Injektion von PBS Puffer wurde verzichtet, da in vorangegangenen Arbeiten bereits gezeigt werden konnte, dass die i.p. Injektion von PBS-Puffer keine Auswirkung auf die Abortrate im Vergleich zu nicht behandelten Tieren hatte (Arck *et al.*, 1995).

2.4 Abortrate in Prozent

Am Tag 13 der Trächtigkeit wurden die Weibchen mittels Genickbruch getötet und die Uteri präpariert. Es wurde die Anzahl an erfolgreichen Implantationen im Verhältnis zur Anzahl an Resorptionen (=Aborte) protokolliert. Resorption wurde anhand der Größe sowie der hämorrhagischen und nekrotischen Zersetzung diagnostiziert. Der Prozentsatz an Resorptionen wurde durch das Verhältnis von Resorptionen zu erfolgreichen Implantationen ermittelt. Abbildung 3 zeigt ein Horn des V-förmigen Mausuterus mit Resorptionen und Implantationen.

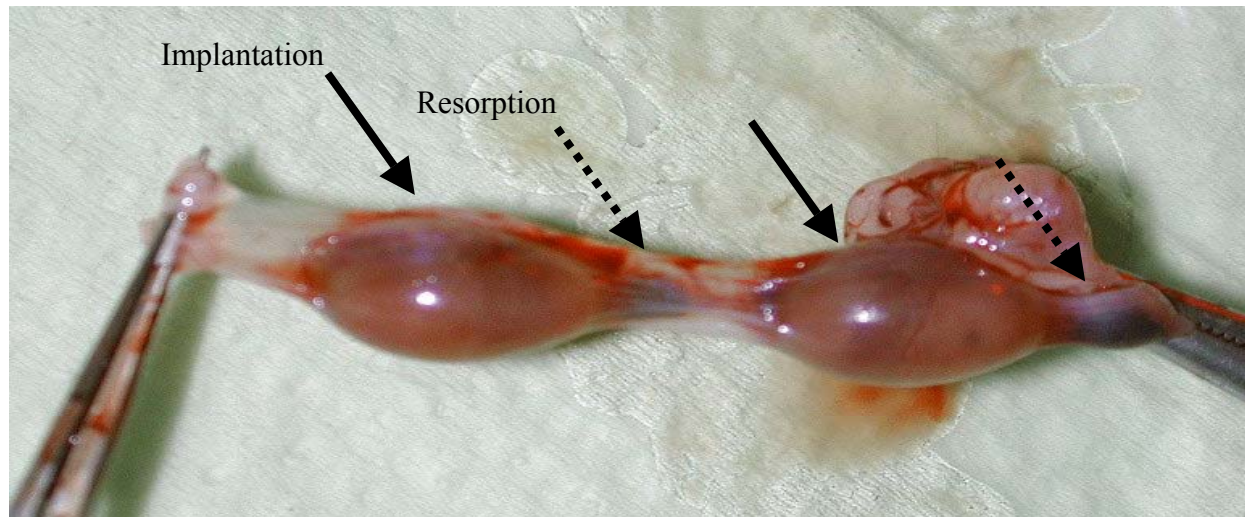


Abbildung 3: **Darstellung eines der Seitenhörner des V-förmigen Mausuterus**

Dargestellt sind zwei Implantationen (—▶) und zwei Resorptionen (-----▶) in einem Mausuterus am Tag 13,5 der Trächtigkeit, daher liegt in dem oben dargestellten Seitenhorn des Uterus eine Abortrate von 50% vor.

2.5 Gewebepräparation

Für die molekularbiologischen Untersuchungen wurden 100mg des Uterusgewebes von Stellen erfolgreicher Implantationen präpariert und vorsichtig mit sterilem PBS (pH=7.4) gewaschen und darauf unverzüglich mittels flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80°C bis zur RNA-Isolation aufbewahrt. Es wurden keine Gewebeproben von der Resorptionsseite entnommen, da das Gewebe bereits hämorrhagisch und nekrotisch zersetzt war und Probeversuche gezeigt hatten, dass sich dieses Gewebe zur Zytokindiagnostik nicht eignet.

2.6 Total-RNA-Extraktion

Material:

Trizol

Gibco BRL, Karlsruhe, D

Chloroform

Merck, Darmstadt, D

Ethanol (100%, 75%)

Merck, Darmstadt, D

Agarosegel 1,5%

Biozym, Oldendorf, D

Ethidium-Bromid (10mg/ml)

Gibco BRL, Karlsruhe, D

Despergierstation

T 8.10, IKA Labortechnik

Zentrifuge (5415C)

Eppendorf, Hamburg, D

100mg des Mausuterus wurden mit ca. 1ml Trizol behandelt und mit dem Dispergiergerät homogenisiert. Danach wurden 200µl, auf –20°C abgekühltes, Chloroform hinzugegeben und das Ganze vermischt. Durch Zentrifugation (13.000g, 15min, 4°C) wurde das Gemisch in zwei Phasen aufgetrennt: Die obere Phase, wässrig-klar enthielt die RNA, die untere Phase (zäh-bläulich) die DNA und die Proteine. Zur Präzipitation wurde die obere klare Phase mit der RNA in einem neuen Eppendorfgefäß mit der gleichen Menge an –20°C kaltem, absolutem Ethanol über Nacht bei –20°C gefällt und anschließend zentrifugiert (18.000g, 15min, 4°C). Die ausgefallene RNA wurde dann mit 500µl 75%-Ethanol gewaschen und danach erneut zentrifugiert (5000g, 8min, 4°C). Der Überstand wurde verworfen, die RNA für 20min getrocknet, um dann in 20µl DEPC-gereinigtem Wasser gelöst zu werden. Die RNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt auf der Grundlage, dass 1OD bei 260nm 40µg RNA entspricht. Die Qualität der extrahierten RNA wurde mittels Elektrophorese in Ethidium-Bromid gefärbtem 1,5% Agarosegel geprüft.

2.7 DNase-Behandlung der RNA-Proben

Material:

DNase I 100 U (1U/µl)

Roche, Mannheim, D

EDTA

Sigma-Aldrich, Steinheim, D

Nach der RNA-Isolation wurde die Total-RNA mit DNase I mit 1U/l pro µg-RNA für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die DNase durch die Zugabe von EDTA inaktiviert. Nach der DNase Behandlung konnte keine genomische DNA mehr durch PCR nachgewiesen werden.

2.8 Reverse Transkription

Material:

Random Hexamer

Gibco BRL, Karlsruhe, D

dNTP-Mix (2 mM)

Gibco BRL, Karlsruhe, D

Erststrangpuffer

Invitrogen, Groningen, NL

DTT (100mM)

Invitrogen, Groningen, NL

Superscript II (200U/µl)

Gibco BRL, Karlsruhe, D

Thermocycler (MasterCycler 5530)

Eppendorf, Hamburg, D

Zur Gewinnung von cDNA für die PCR wurde die gereinigte mRNA durch eine reverse Transkription mit Hilfe einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase umgeschrieben. An das Poly-A-Ende der RNA-Moleküle wurde ein Thymin-Oligonukleotid anhybridisiert und diente als Matrize für die weitere Kettenverlängerung. Die Ribonuklease aus der reversen Transkriptase hydrolysierte den RNA-Teil des entstehenden RNA/DNA-Hybridstranges, so dass in einem zweiten Durchgang der komplette DNA-Doppelstrang durch die reverse Transkriptase synthetisiert werden konnte.

2µg der extrahierten RNA wurden mit 2µl Random Hexamer versetzt, für 10min bei 70°C inkubiert und durch anschließendes Abschrecken auf Eis (1 min) denaturiert. Dann wurden pro Ansatz 5µl dNTP Mix, 4µl Erststrangpuffer, 2µl DTT und 1µl Superscript II hinzugegeben. Der 20µl Ansatz wurde im Thermocycler für 10min auf 25°C gebracht, danach für 60min bei 42°C und 10min bei 70°C inkubiert. Die cDNA wurde entweder unverzüglich weiterverarbeitet oder bei -20°C aufbewahrt. Kontrollproben enthielten das Reaktionsgemisch ohne RNA, wobei keine cDNA synthetisiert wurde.

2.9 Qualitative PCR

Material:

dNTP-Mix (2mM)	Gibco BRL, Karlsruhe, D
10 x Gold-Taq-PCR-Reaktionspuffer	Applied Biosystems, CA, USA
Forward-Primer (20µM)	Tib-Molbiol, Berlin, D
Reverse-Primer (20µM)	Tib-Molbiol, Berlin, D
AmpliTaq-Gold DNA-Polymerase (1U/µl)	Applied Biosystems, CA, USA
Thermocycler (MasterCycler 5330)	Eppendorf, Hamburg, D

Durch Bindung der Primer werden bestimmte Sequenzen der durch die Reverse-Transkription gewonnenen cDNA durch die Polymerasekettenreaktion amplifiziert: Der cDNA-Doppelstrang wird durch eine Erhöhung der Temperatur auf 94°C denaturiert (hot start), anschließend werden zwei aus 15 bis 25 Basenpaaren bestehende Oligonukleotide (Primer) zugesetzt, die am Anfang und Ende der zu amplifizierenden Sequenz an die cDNA binden. Die DNA-Polymerase synthetisiert einen neuen DNA-Strang, der jeweils zu dem als Matrize dienenden Einzelstrang komplementär ist. Dadurch entstehen während jedes Reaktionszyklus 2^x doppelsträngige Kopien der cDNA-Sequenz.

2µl des RT-Produktes wurde mit 31µl Aqua dest., 7,5µl dNTP-Mix, 5µl 10 x Gold-Taq-PCR-Reaktionspuffer, jeweils 2µl forward- bzw. reverse-Primer und 0,5µl Gold-Taq-DNA-Polymerase versetzt. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz ohne RT-Produkt, um eine Kontamination auszuschließen. Der 50µl Ansatz wurde im Thermocycler amplifiziert. 1 Zyklus 10min bei 94°C (hot start), darauf folgten 40 Zyklen jeweils 30s 94°C, 45s 60/63°C und 1min 72°C, danach wieder 1 Zyklus 10min bei 72°C. Die PCR-Produkte wurden elektrophoretisch dargestellt.

2.10 Die Agaroseelektrophorese

Material:

Ultra Pure Agarose	Biozym, Oldendorf, D
50 x TAE (Tris-Azetat-EDTA) ad 1l Aqua dest. (pH = 8,0):	
- Tris Base (40mM)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
- Eisessigsäure (20mM)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
- EDTA (2mM)	Sigma-Aldrich Steinheim, D
Ethidium-Bromid	Gibco BRL, Karlsruhe, D
10 x DNA-Probenpuffer	Gibco BRL, Karlsruhe, D
100bp-Leiter	Gibco BRL, Karlsruhe, D
Biometra Volt	Biometra, Göttingen, D
UV-Transluminator	Fröbel, Lindau, D
Sofortbildkamera	Polaroid, Offenbach, D

Die Gelelektrophorese nutzt das Verhalten von Proteinen bzw. RNA und DNA im elektrischen Feld. Die Wanderung wird durch Nettoladung, Größe und Gestalt bestimmt. Die negativ geladenen Basen der Nukleinsäuren wandern zur positiv geladenen Elektrode und werden durch die Struktur des Agarosegels nach Größe getrennt.

Die Agarose wurde in einer Konzentration zwischen 1% und 3% in 1 x TAE Lösung durch Erhitzen gelöst. Zu 100ml der Lösung wurden 1µl Ethidium-Bromid gegeben und durch Schwenken vermischt. Die flüssige Agaroselösung wurde in einen Gelschlitten gegossen und für mindestens 20min unbewegt zum Trocknen gelassen. Der Gelschlitten mit Gel wurde in eine Gelkammer gelegt, die mit 1 x TAE Puffer gefüllt war, so dass das Gel vollständig vom Puffer bedeckt war. Die Proben wurden mit 1µl bis 3µl DNA-Probenpuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Als Marker diente eine 100 Basenpaarleiter. Die elektrophoretische Auftrennung er-

folgte bei 90V bis 100V. Das Ethidium-Bromid interkaliert die DNA und dadurch wurde eine Visualisierung bei 312nm mit einem UV-Transluminator möglich. Die Dokumentation erfolgte mit einer Sofortbildkamera.

2.11 Quantitative PCR

Material:

Master Mix:

- 15,2µl H ₂ O	Braun, Melsungen, D
- 2,5µl 10x Reaktionspuffer	Applied Biosystems, CA, USA
- 2µl dNTP's (2,5mM)	Gibco BRL, Karlsruhe, D
- 2,25µl MgCl ₂ (50mM)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
- 0,4µl TE (Tris-EDTA)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
- 0,25µl ROX	Tibmol-Biol, Berlin, D
Forward Primer (20µM)	Tibmol-Biol, Berlin, D
Reverse Primer (20µM)	Tibmol-Biol, Berlin, D
TaqMan-Sonde (10µM)	Tibmol-Biol, Berlin, D
AmpliTaq Platin	Applied Biosystems, CA, USA
ThermoFast, Plates	Rapidozym, Berlin, D
Flat Cap Stripes	Rapidozym, CA, USA
ABI PRISM 7700 Sequence Detector	Perkin Elmer, CA, USA
“Sequence Detections Systems“-Software	Perkin Elmer, CA, USA

Die TaqMan-PCR ist eine Methode zur quantitativen Detektion und Analyse von cDNA, die durch Reverse-Transkription aus RNA hergestellt wurde. Dabei werden der cDNA Probe zwei Primer-Moleküle und eine Sonde, die jeweils spezifisch für die zu messende Sequenz sind, hinzugefügt. Primer und Sonde binden an den für sie spezifischen Abschnitt der cDNA. Die Sonde ist an beiden Enden mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Am 5'-Ende der Sonde befindet sich der Reporter mit dem Farbstoff FAM (6-Karboxifluoreszein) und am 3'-Ende der Quencher mit der Farbe TAMRA (6-Karboxi-N,N,N',N'-Tetramethylrhodamin). Ist die Sonde an die cDNA gebunden, unterdrückt der Quencher an dem einen Ende der Sonde das Fluoreszenzsignal des Reporters am anderen Ende der Sonde. Diese Auslöschung des Fluoreszenzsignals des Reporters beruht auf dem Effekt des Resonanz-Energie-Transfers und ist an die linear räumliche Anordnung der beiden Moleküle gebunden. Startet nun die PCR und wird der komplementäre Strang

zu dem Abschnitt, an dem die Sonde gebunden ist, durch die DNA-Polymerase synthetisiert, bedingt das eine Spaltung der Sonde von der cDNA. Durch diese Abspaltung der Sonde wird die strenge, lineare Anordnung der beiden Fluoreszenzmoleküle zueinander aufgehoben und der Resonanz-Energie-Transfer unterbrochen. Dadurch sendet das Reporter-Molekül sein Fluoreszenzsignal, welches mittels des TaqMan registriert werden kann. Folglich erhält man für jede synthetisierte cDNA-Sequenz des spezifischen Abschnittes ein Fluoreszenzsignal. Dieser Prozess wiederholt sich in jedem Zyklus und interferiert nicht mit der exponentiellen Akkumulation des PCR-Produktes.

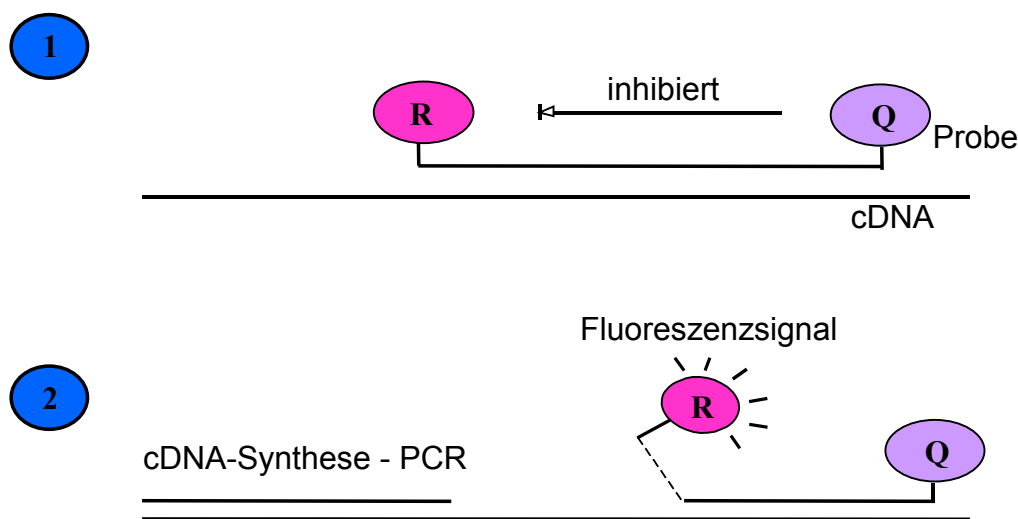


Abbildung 4: **Prinzip der quantitativen PCR**

1. Die Sonde ist linear an die cDNA gebunden und das Quencher-Molekül inhibiert die Fluoreszenz des Reporters.
2. Bei der Synthese der cDNA wird die Sonde von der cDNA abgespalten. Der Quencher inhibiert nicht länger den Reporter.

1µl RT-Produkt wurde mit 0,5µl Forward-Primer, 0,5µl Reverse-Primer, 0,3µl TaqMan-Sonde, 0,1µl Amplitaq Platin und 22,6µl Master Mix versetzt. Als Reaktionsgefäße wurden spezielle Micro-Amp-Optical-Tubes mit entsprechenden Micro-Amp-Optical-Caps verwendet. Als Negativkontrolle dienten Ansätze ohne das RT-Produkt, um eine Kontamination der Templates auszuschließen. Pro gemessener Platte wurden mindestens drei Negativkontrollen pipettiert. Wenn möglich wurden die Primer so gewählt, dass sie Intron-überspannend waren. Als erster Zyklus der Amplifikation wurde das Reaktionsgemisch für 10min auf 95°C (hot start) erhitzt, anschließend folgten 40 Zyklen von jeweils 15sec bei 95°C und 1min bei der jeweilig spezifischen Temperatur, die optimal für die Sonde ist (siehe Tabelle unten). Die Echtzeitanalyse wurde durch spezielle Software (siehe oben) ausgewertet. Alle gemessenen Daten wurden auf HPRT

(Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase) als Referenzgen bezogen. Die Sonden wurden alle auf ihre Spezifität für cDNA geprüft, das heißt genomische DNA wurde nicht amplifiziert.

<u>Primer-Sequenzen:</u>
Murines HPRT: Ex 7,8: 5'-gTTggATACAggCCAgACTTTgT Reverse: 5'-CACAggACTAgAACACCTgC
Murines IFN-γ: Forward: 5'-CagCAACAACATAAgCgTCAT Reverse: 5'-CTCCTTTTCCgCTTCCTgA
Murines TNF-α: Forward: 5'-AgCCTgTAgCCCACgTCgTAg Reverse: 5'-ggCagCCTTgTCCCTTgAAg
Murines fgl2: Forward: 5'-CAACAgTTTggATggCAAgTg Reverse: 5'-CTTTgTATATTAgATgAACCgg
Murines IL-12 p40: Forward: 5'-TTCAGTgTCCTgCCAggAgg Backward: 5'-CgggTCTggTTTgATgATgTC
Murines IL-12 p35: Forward: 5'-CCACCCTTgCCCTCCTAAAC Reverse: 5'-ggCagCTCCCTCTTgTTgTg

<u>Sonden-Sequenzen:</u>
Murines HPRT: 5'-6FAM-TTgCAGATTCAACTTgCgCTCA XT CTT p PCR-Temperatur: 60°C oder 63°C
Murines IFN-γ: 5'-6FAM-TTCCggCAACAgCTggTggACCAC XT p PCR-Temperatur: 60°C
Murines TNF-α: 5'-6FAM-gTAgACAaggTACAACCCA XT CggCTg p PCR-Temperatur: 63°C
Murines fgl2: 5'-6FAM-gTgTCCCAgCCAAgAACACA XT gCA p PCR-Temperatur: 63°C

Murines IL-12 p40: 5'-6FAM-TgTCACCCTgCCCAAC XT gCCgAg p

PCR-Temperatur: 60°C

Murines IL-12 p35: 5'-6FAM-ACCTCAgTTTggCCAgggTCAT XT CCA p

PCR-Temperatur: 60°C

Das X steht für den Quencherfarbstoff Tamra.

2.12 Analyse der Taq-Man-Daten

Nach 40 Zyklen berechnet der Computer den Verlauf der Intensität der Fluoreszenz im Verhältnis zur Basisfluoreszenz des dem Master Mix beigelegtem Rox-Farbstoffes. Der dazugehörige Graph folgt einem s-förmigen Verlauf. Auf dieser Grundlage berechnet der Computer den Zyklus, bei dem die anfängliche Fluoreszenz exponentiell ansteigt. Dieser Zyklus (Zyklus C_t) wird für jede Probe individuell berechnet. Für jede Probe wurden drei Messungen durchgeführt, wobei der Mittelwert aus den jeweiligen C_t -Werten gebildet wurde. Der C_t -Wert ist linear abhängig von der Menge an cDNA der jeweiligen Sequenz. Je früher die exponentielle Phase der PCR beginnt (= C_t -Wert), desto häufiger findet sich die Sequenz in der untersuchten cDNA. Da bei der quantitativen Bestimmung der Ausgangsmenge an cDNA mittels Photometer sowie dem Pipettieren kleine Ungenauigkeiten nicht sicher vermieden werden können, wird der C_t -Wert der Zytokinsequenz bei jeder Messung individuell ins Verhältnis zum C_t -Wert des HPRT der jeweiligen Probe gesetzt. Es wird folglich ein ΔC_t -Wert für jede Probe gebildet:

$$\Delta C_t = C_t(\text{HPRT}) - C_t(\text{Zytokin})$$

Ein niedriges ΔC_t , also ein geringer Unterschied in der Menge von HPRT-Expression und Zytokinexpression, bedeutet, dass die Zytokinsequenz in der cDNA, die aus mRNA gewonnen wurde, häufig exprimiert ist. Für eine vereinfachte Darstellung gilt, hohe Werte entsprechen einer großen Menge an cDNA. Hierzu ist eine Formel entwickelt worden, die folgende empirisch gewonnen Werte berücksichtigt: Durch eine Verdünnungsreihe wurde ermittelt, dass ein ΔC_t von 3.41 einer Verzehnfachung der Menge an cDNA entspricht.

Folgende Umwandlungsformel wurde berechnet:

$$\Delta C_t' = 1/2 \Delta C_t$$

Diese Formel wurde benutzt, um die ΔC_t in Säulendiagrammen grafisch darstellen zu können. Nach der Umwandlung muss der Wert mit einem Faktor x (z. Bsp. 10000) multipliziert werden. Für die Darstellung der Korrelation erwies sich die Umwandlung durch diese Formel als zu grob. Daher wurde zur besseren Visualisierung der Korrelationen die Umwandlung vereinfacht:

$$1/\Delta C_t$$

2.13 Präparation von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab (Minipräparation)

Material:

E.coli Glyzerol-Stamm (pUC19) mit pBluescript®SK(+/-) mit Maus-fgl2-Sequenz

Kulturmedium (LB-Medium)

- 1g Tryptan	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
- 0,5g Pilz-Extrakt	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
- 5g Kochsalz	Merck, Darmstadt, D
- 100 ml steriles Aqua dest.	Braun, Melsungen, D

Kultur-Agar (LB-Agar)

- 5g Tryptan	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
- 2,5 g Pilz-Extrakt	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
- 5g Kochsalz	Merck, Darmstadt, D
- 7,5 g Agar	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
- 500 ml steriles Aqua dest.	Braun, Melsungen, D

Ampicillin (100mg/ml)

Sigma-Aldrich, Steinheim, D

QIAprep Spin Miniprep Kit

Qiagen, Hilden, D

Brutschrank

Heraeus, Hanau, D

Die Plasmid-DNA diente als Matrize unter anderem zur Gewinnung der für die In-situ-Hybridisierung benötigten RNA-Sonde. Der Escheria-coli-Glyzerolstock enthielt Bakterien mit einem Plasmid, welches die benötigte DNA-Sequenz und gleichzeitig die Information der Ampicillin-Resistenz kodierte. Zunächst wurde 1µl des Glyzerol-Stockes auf einer Agarplatte ausgestrichen und im Brutschrank für eine Nacht (37°C) inkubiert. Dann wurde eine Kolonie geerntet, auf einer neuen Agarplatte ausgestrichen und vor erneuter Inkubation mit Ampicillin beimpft. Dadurch wurden ausschließlich die Plasmid tragenden Bakterien selektiert. Die Plasmid-DNA wurde durch Reinigung auf einer Silikagel-Membran aus den Bakterien gewonnen.

Darauf folgten: Inkubation der LB-Kulturmediums mit 1µl des E.coli-Glyzerol-Stammes über Nacht bei 37°C im Brutschrank, Selektion der Phagen tragenden Bakterien durch die Inkubation einer Kolonie mit 10µg Ampicillin in 10ml Kulturmedium (LB-Medium) über Nacht bei 37°C. Anschließend erfolgte die Plasmidpräparation nach dem Protokoll des QIAprep-Spin-Miniprep-Kits: Zunächst wurde eine alkalische Lyse durchgeführt, um anschließend die DNA durch ein Silikagel zu extrahieren. Silika (Kieselgel) ist ein chaotropes Salz, welches die DNA durch Entfernung der Hydrathülle zu binden vermag. Anschließen wurde die DNA eluiert und in 50µl 10mM Tris-HCl (niedrige Salzkonzentration) gelöst. Die Konzentration der Plasmid-DNA betrug 0,7µg/µl.

2.14 Linearisierung der Plasmid-cDNA

Material:

pBluescript®SK(+/-) mit humanem TNF-α/

Maus-fgl2-Sequenz

Stratgene, Amsterdam, NL

Restriktionsenzyme Sma I und EcoR V

Promega, Mannheim, D

Restriktionspuffer

Promega, Mannheim, D

DEPC H₂O

Sigma-Aldrich, Steinheim, D

Agarosegel (1-1,2%):

- 0,7-0,8g Agarose

Biozym, Oldendorf, D

- 70-80ml TAE-Puffer

Sigma-Aldrich, Steinheim, D

- 1µl Ethidium-Bromid (1µg/ml)

Gibco BRL, Karlsruhe, D

Biometra Volt

Biometra, Göttingen, D

UV-Transluminator

Fröbel, Lindau, D

Für die fgl2-Sonde wurde das aus 650 Basenpaaren bestehende Exon 2 des murinen fgl2 verwandt. Um die Plasmid-DNA in eine RNA-Sonde für die In-situ-Hybridisierung umschreiben zu können, muss die DNA-Sequenz aus dem Plasmid isoliert und linearisiert werden. Dazu wurde das Plasmid an den vorgesehen Abschnitten mit den Enzymen Sma I und EcoR V geschnitten, um dann die DNA mit Hilfe der Agaroseelektrophorese (siehe oben) aufzutrennen. Anschließend musste die DNA aus dem Gel herausgelöst und gereinigt werden.

Inkubation von 20µl Plasmid-DNA mit 2µl des jeweiligen Restriktionsenzym sowie 3µl Puffer und 5µl H₂O für 2h bei 37°C zur Linearisierung der Plasmid-DNA. Nach der Inkubation wurde die linearisierte cDNA (3µl) mit 3µl H₂O plus 1µl Farbpuffer auf das Agarosegel aufgetragen.

Das Gel wurde bei 100V für ungefähr 35-45min laufen gelassen. Die cDNA wurde aus dem Gel mit einer RNase freien Rasierklinge ausgeschnitten und mit dem QIAquick-Gel-Extraktions-Kit aus dem Gel herausgelöst. Das Prinzip des Kits beruht auf einer Silikagel-Membran zur Bindung von DNA in hoch konzentrierter Salzlösung. Die gereinigte dsDNA wurde anschließend in 50µl 10mM Tris-HCl gelöst und bei -20°C aufbewahrt.

2.15 Synthese der ³⁵S-markierten RNA-Sonde

Die TNF-α-Sonde für humanes Gewebe wurde uns freundlicherweise von Dr. Richard Lea vom Rowett Research Institute, Aberdeen, Schottland überlassen. Die fgl₂-Sonde für murines Gewebe wurde in der klinischen Forschergruppe „Transplantation“ des Toronto Hospitals, Toronto, Kanada entwickelt und für die Nutzung freigegeben.

Material:

Linearisierte cDNA (SmaI und EcoR V)

Polymerasen T3 und T7

Promega, Mannheim, D

Transkriptionskit

Roche, Mannheim, D

DNase

Roche, Mannheim, D

DTT

Promega, Mannheim, D

DNTP's (2mM)

Boehringer, Mannheim, D

Spin Column

Sigma-Aldrich, Steinheim, D

Diethylpyrocarbonat (DEPC)

Sigma-Aldrich, Steinheim, D

³⁵S-UTP

NEN Dupont, B

Die Plasmid-DNA wird für die In-situ-Hybridisierung in eine mRNA-Sonde umgeschrieben. Trotz des wesentlich höheren Arbeitsaufwandes durch die Verwendung einer mRNA-Sonde für die In-situ-Hybridisierungsmethode rechtfertigt die wesentlich höhere Spezifität und Stabilität von mRNA-mRNA-Hybridisierungen im Vergleich zu mRNA-cDNA-Hybridisierungen dieses methodische Vorgehen. Die DNA-abhängige RNA-Polymerase T₃ synthetisiert die RNA – beginnend am EcoR V geschnittenen Ende der DNA – und somit entsteht die mRNA-Antisense-Sonde. Die Antisense-Sonde verhält sich spiegelbildlich zur nachzuweisenden mRNA-Sequenz. Die Polymerase T₇ synthetisiert die RNA vom Sma I geschnittenen Ende der DNA aus, woraus die Sense-Probe extrahiert werden kann als identische Basenfolge der nachzuweisenden mRNA. Durch die Sense-Sonde kann daher keine Bindung an die nachzuweisende mRNA erfolgen und

dient hiermit als Negativkontrolle, also dem Nachweis, dass die vorgenommene mRNA-Hybridisierung mit der Antisense-Sonde spezifisch für die Sequenz stattgefunden hat.

2.16 In-situ-Hybridisierung

Material:

Xylol

Merck, Darmstadt, D

Ethanol (100%, 90%, 70%)

Merck, Darmstadt, D

0,2 N HCl

Sigma-Aldrich, Steinheim, D

SSC (Sodium Chlorid Sodium Citrat) (0,1x, 0,5x, 1x, 2x, 4x):

- 175,32g NaCl (3M)

Merck, Darmstadt, D

- 88,23g Na-Citrat (0,3M)

Sigma-Aldrich, Steinheim, D

- 1l DEPC-H₂O

Sigma-Aldrich, Steinheim, D

DEPC

Sigma-Aldrich, Steinheim, D

Proteinkinase Puffer:

- 80ml 1m TRIS

Sigma-Aldrich, Steinheim, D

- 40ml 0,5m EDTA

Sigma-Aldrich, Steinheim, D

- 280ml DEPC H₂O

Sigma-Aldrich, Steinheim, D

- Proteinkinase K 80µl 10mg/ml

Sigma-Aldrich, Steinheim, D

PBS (Phosphate Saline Buffer)

- 8g NaCl

Merck, Darmstadt, D

- 1,16g Na₂HPO₄

Sigma-Aldrich, Steinheim, D

- 0,2g KH₂PO₄

Sigma-Aldrich, Steinheim, D

- 0,2g KCl

Sigma-Aldrich, Steinheim, D

0,4% Paraformaldehyd in PBS

Sigma-Aldrich, Steinheim, D

0,1m TEA mit 0,25% Acetic Anhydrid

Sigma-Aldrich, Steinheim, D

Hybmix mit:

- 2,5ml Formamid

Sigma -Aldrich, Steinheim, D

- 300µl 5m NaCl

Merck, Darmstadt, D

- 100µl Denhardtts

Sigma-Aldrich, Steinheim, D

- 50µl 1m TRIS

Sigma-Aldrich, Steinheim, D

- 10µl 0,5m EDTA

Sigma-Aldrich, Steinheim, D

- 915µl DEPC H₂O

Sigma-Aldrich, Steinheim, D

- 1ml Dextransulfat

Sigma-Aldrich, Steinheim, D

- 100µl t-RNA	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
- 25µl 2m DTT	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
- DPX	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
RNAse (6mg/ml) in 200ml Waschpuffer (20 µg/ml)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
- 20ml 5m NaCl	Merck, Darmstadt, D
- 2ml 1m Tris	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
- 0,4ml 0,5m EDTA	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
- 178ml Aqua dest	Braun, Melsungen, D
- SSC+DDT (2m)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Fotoentwicklung:	
- Entwickler	Kodak, Stuttgart, D
- 1% Essigsäure	Merck, Darmstadt, D
- Fixierer	Kodak, Stuttgart, D
Harris Hämatoxylin	Merck, Darmstadt, D

Bei der In-situ-Hybridisierung wird in einem fixierten Gewebe (Plazenta, Dezidua) die mRNA eines Proteins nachgewiesen. Insbesondere Zytokinproteine werden *in vivo* in kurzer Zeit metabolisiert. Der zusätzliche Nachweis der mRNA-Sequenz des Proteins im Gewebe weist sowohl die Synthese des Proteins im Gewebe selbst als auch die Fähigkeit zur Produktion des Zytokins bei negativem Ergebnis der Proteinfärbung (Immunhistochemie). Die In-situ-Hybridisierung erlaubt keinen unmittelbaren Rückschluss auf die Menge an synthetisierten Protein, wohingegen sich aus dem Nachweis des Proteins (Immunhistochemie) keine Schlüsse auf den Syntheseort des Proteins ziehen lassen. Aus diesen Gründen erscheint es sinnvoll, die Methode der In-situ-Hybridisierung mit der Methode der Immunhistochemie zu verknüpfen. In dieser Arbeit ist die Methode der In-situ-Hybridisierung auf den qualitativen Nachweis sowie die Lokalisation der mRNA im Gewebe beschränkt worden, da eine quantitative Auswertung der In-situ-Hybridisierung aus oben genannten Gründen problematisch erschien.

Die Schnitte wurden entparaffiniert, rehydriert und in 0,2N HCl gewaschen (20min). Anschließend folgte ein Waschgang mit 2 x SCC (30min, RT). Zur Andauung der Proteinstrukturen wurden die Schnitte mit Proteinkinase behandelt (5min, 37°C), um darauf mit 0,4%igem PFA (20min, 4°C) fixiert zu werden. Daraufhin erfolgte die Inkubation der Schnitte mit 0,25% Acetic Anhydrid (10min, RT) zur Vermeidung der unspezifischen Bindung an positiv geladene Aminogruppen. Vor Auftragen des Hybridisierungsmix wurden die Schnitte dehydriert und getrocknet. Nach Applikation der Sonde Antisense oder Sense – gelöst im Hybridisierungsmix – wur

den die Schnitte mit Deckgläschen und DPX versiegelt, um eine Kontamination zu vermeiden. Zur Hybridisierung wurden die Schnitte über Nacht bei 59°C inkubiert. Um Hintergrundfärbung durch überschüssige RNA-Sonde zu vermeiden, erfolgte eine Behandlung mit RNase A (30min, 37°C), nachdem die Schnitte gründlich mit 4 x SSC gewaschen wurden. Die RNase spaltet nur Einzelstrang-RNA. Es folgten mehrere Waschgänge mit absteigenden Konzentrationen von SSC und DDT (5-30min, RT und 60°C). Danach wurde in der aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert. Nach dem die Schnitte getrocknet waren, wurden sie in der Dunkelkammer in die Kodak-autoradiografische Emulsion getaucht und verpackt (Alufolie). Das Entwickeln fand zwei Wochen später statt. Danach wurden die Schnitte mit Harris Hämatoxylin gegengefärbt. Die Färbungen wurden bei 200facher Vergrößerung am Axiophot-Mikroskop ausgewertet; die Fotografien entstanden in Anwendung des integrierten Hyper-HAD.

2.17 Immunhistochemie

Der fgl2-Antikörper für murines Gewebe wurde mit freundlicher Genehmigung der klinischen Forschergruppe „Transplantation“ des Toronto Hospitals, Toronto, Kanada angewendet.

Material:

Ethanol (100%, 95%, 70%)	Merck, Darmstadt, D
Xylol	Merck, Darmstadt, D
Methanol	Merck, Darmstadt, D
H ₂ O ₂ (30%)	Merck, Darmstadt, D
Proteinblock	DAKO, Hamburg, D
„Antibody Diluent“	DAKO, Hamburg, D
„Biotinylated Link“	DAKO, Hamburg, D
Streptavidin-HRP	DAKO, Hamburg, D
DAB, Entwickler	DAKO Corporation, D
Hämalaun	Holborn & Söhne, Leipzig, D
Vitroclud	Langenbrink, D
Citratpuffer PH=6	
- Stammlösg. A (C ₆ H ₈ O ₇ x H ₂ O) 18ml	Merck, Darmstadt, D
- Stammlösg. B (CH ₂ CO ₂ Na) 82ml	Merck, Darmstadt, D
- Aqua dest. 900ml	Braun, Melsungen, D

Pufferlösung TBS (1l):

- Tris Base 0,9g	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
- Tris-HCL 6,85g	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
- NaCl 8,78g	Merck, Darmstadt, D
Antikörper, Fluoreszenzen:	
TNF- α Antikörper (1:300)	Genzyme, Rüsselsheim, D
Fgl2 Antikörper bei den Präeklampsie-Schnitten (1:500)	AG „Transplantation“
Kaninchen IgG (je nach primärer Antikörperkonzentration) (1:250; 1:300 oder 1:500)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Mikroskop Axiophot	Zeiss, Jena, D
Fotoapparat Hyper HAD	Sony, Köln, D
Coverplates	Hypersil, Aschaffenburg, D

Die Schnitte wurden entparaffiniert (Xylol) und rehydriert (absteigende Alkoholreihe). Blockierung unspezifischer Peroxidaseaktivität des Gewebes durch 3% H₂O₂ in Methanol (30min, RT). Demaskierung des Antigens durch 10minütiges Kochen in Citratpuffer (bei Überdruck). Als nächster Schritt erfolgte die Behandlung mit Proteinblock (150 μ l pro Schnitt). Nach der Blockierung wurden die Antikörper hinzugegeben. Die Inkubationszeit betrug bei allen Färbungen 1h bei RT. Danach wurden die folgenden Substanzen nacheinander aufgetragen: Biotinylated Link (150 μ l pro Schnitt, 10min, RT), Streptavidin-HRP (150 μ l pro Schnitt, 10min, RT), DAB + 3% H₂O₂ (150 μ l pro Schnitt, 5min, RT). Nach jedem der vorangegangenen Schritte wurde gründlich mit TBS gespült. Der Antikörper wurde ohne Waschgang nach dem Proteinblock aufgetragen. Es folgten die Gegenfärbung mit Hämalaun, das Auswaschen mit kaltem Leitungswasser, eine aufsteigende Alkoholreihe und das Eindeckeln mit Vitroclud. Negativkontrollen wurden mit unspezifischem Kaninchen-Antikörpern (IgG) durchgeführt.

Die Färbungen wurden bei 400facher Vergrößerung am Axiophot-Mikroskop ausgeführt; die Fotografien entstanden in Anwendung des integrierten Hyper-HAD.

2.18 TUNEL-Färbung

Material:

TUNEL Kit	Intergen, Heideberg, D
4[prime],6-diaidino-2[prime]-phenylindole dihydrochlorid (DAPI)	Roche, Mannheim, D
VectaShield	Vector Lab., Burlingame, VT

Zur Untersuchung auf Apoptose wurden sowohl gefrorene Schnitte (Kryoschnitte) als auch in Paraffin eingebettete Schnitte verwandt. Die Paraffinschnitte mussten entparaffiniert und rehydriert werden (siehe oben). Die Kryoschnitte wurden in Formalin fixiert und in Ethanol-Essigsäure postfixiert. Anschließend wurden alle Schnitte der gleichen Behandlung unterzogen. Die fragmentierte DNA wurde mit Digoxigenin-dUTP in Gegenwart von TdT markiert und diese TUNEL⁺-Zellen durch die Bindung von Anti-Dioxigenin Fluoreszein Isothiozyanat (FITC)-konjugierten F(ab[prime])₂-Fragmenten fluoreszenzgefärbt. Die Gegenfärbung erfolgte mit DAPI (1µg/ml Methanol). Mit Deckgläschen und VectaShield wurden die Schnitte vor dem Austrocknen geschützt. Negativkontrollen wurden durch Auslassen der Zugabe von TdT nach den Angaben des Kit-Protokolls durchgeführt.

2.19 Giemsa-Färbung

Material:

Xylol	Merck, Darmstadt, D
Ethanol (100%, 90%, 75%)	Merck, Darmstadt, D
Giemsa-Lösung 1:10 in 2% Sodiumborat	Merck, Darmstadt, D
Essigsäure 0,02%	Merck, Darmstadt, D

Die Färbung mit Giemsa dient der spezifischen Anfärbung von Granula in Mastzellen. Die Schnitte wurden entparaffiniert, rehydriert und dann mit der Giemsa-Lösung gefärbt (45min, RT). Danach erfolgte eine Differenzierung der Färbung durch Essigsäure. Die Schnitte wurden in Leitungswasser gewaschen und anschließend dehydriert.

2.20 Statistische Analyse der Daten

Zur semi-quantitativen Auswertung der Immunhistochemie wurde eine Ordinalskala mit den Bewertungen + / ++ / +++ verwandt. Für die statistische Analyse dieser Daten wurde der Mann-Whitney-U-Test als nicht-parametrischer Test für unabhängige Stichproben angewandt. Die Daten sind in Boxplots grafisch dargestellt. Die Auswertung der Echtzeit-PCR erfolgte wie oben beschrieben. Nach annähernder Prüfung auf Normalverteilung wurden die Daten mit dem Student's T-Test ausgewertet und in Balkendiagrammen mit Standardabweichung dargestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Die Erhöhung der Abortrate durch Stress und durch die Injektion von IL-12 p70

Zuerst wurde überprüft, ob die Applikation von Stress in Form von Lärm die Abortrate und/oder die Anzahl erfolgreicher Implantationen reduziert. Die Applikation von Stress am Tag 5,5 der Trächtigkeit induzierte einen Anstieg der Abortrate von 11,9% in den Kontrolltieren auf 24% in den gestressten Tieren ($p < 0,05$; Abbildung 5 A). Die Anzahl der Implantationen wurde durch den Stress nicht wesentlich reduziert (Abbildung 5 B). Die Injektion von 100ng rekombinanten IL-12 p70 am Tag 5,5; 6,5; 7,5 und 8,5 der Trächtigkeit erhöhte die Abortrate ähnlich dem Effekt von Stress von 10,52% auf 24,5% (Abbildung 5 A).

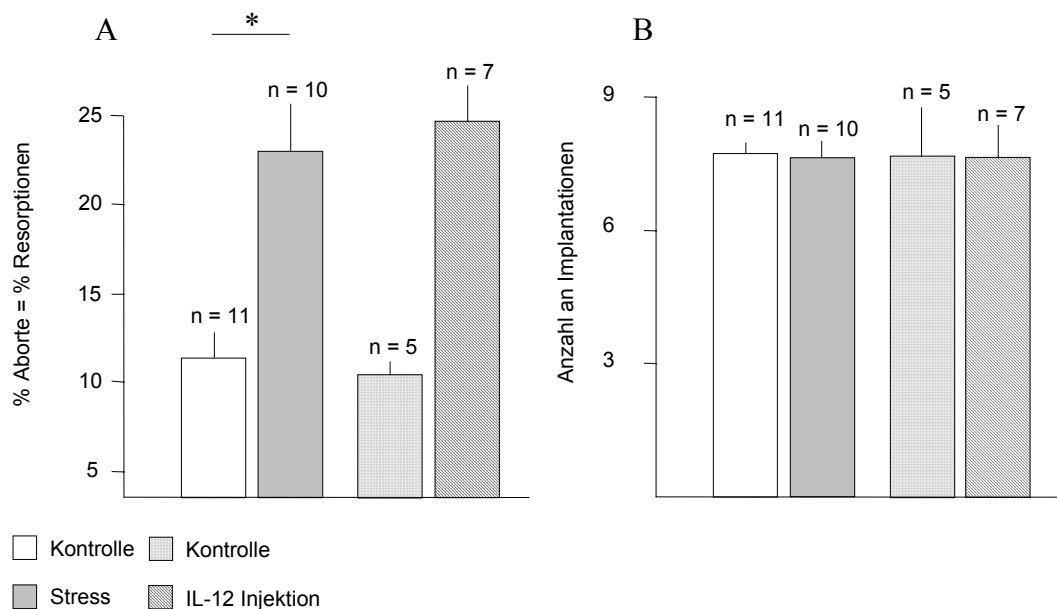


Abbildung 5: **Die Resorptionsraten und Implantationen bei Stress und IL-12-Injektion**

A: Die Resorptionsrate in Prozent lag bei den stressbehandelten und den IL-12-behandelten Tieren zweifach höher als bei den nicht behandelten Tieren (kein Stress, keine Injektionen).

B: Die durchschnittliche Anzahl an Implantationen pro Tier ist hier angezeigt, wobei Stress und IL-12-Injektion die Anzahl der Implantationen geringfügig reduzierten.

3.2 Der Einfluss von Stress auf die mRNA-Expression von abortogenen Zytokinen

3.2.1 Der Anstieg von TNF- α mRNA nach Stressexposition

Messungen mittels Bioassays und die durchflusszytomterische Analyse von uterinen Lymphozyten zeigten einen deutlichen Anstieg von TNF- α Protein nach Stressexposition (Arck *et al.*, 1995; Joachim *et al.*, 2001). Um die Auswirkung von Stress auf die Menge von TNF- α mRNA zu untersuchen, wurde TNF- α mRNA quantitativ mit der „Real-time“-PCR bestimmt. Stressexposition am Tag 5,5, einen Tag nach dem voraussichtlichen Zeitpunkt der Implantation, bewirkte eine Steigerung der Menge an TNF- α mRNA um das 5fache ($p < 0,01$; Abbildung 6).

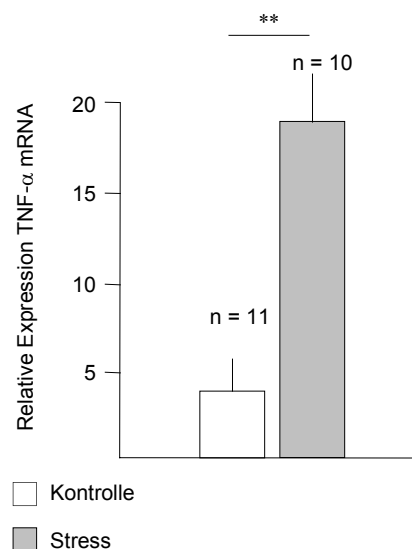


Abbildung 6: **TNF- α mRNA in Stress und Kontrolle**

Ein 5facher Anstieg der Menge an TNF- α nach Stress im Vergleich zu den nichtbehandelten Tieren.

3.2.2 Die IFN- γ -Expression nach Stressapplikation

In der Paarungskombination CBA/J x DBA/2J war eine gleichzeitige Injektion von TNF- α und IFN- γ nötig, um die Abortrate signifikant zu erhöhen. Injizierte man jeweils nur ein Zytokin, war der Effekt auf die Abortrate deutlich geringer als bei der gemeinsamen Applikation. Des Weiteren existieren Daten, die einen signifikanten Anstieg von IFN- γ Protein nach Stressexposition in CD26 positiven Lymphozyten beschreiben (Hildebrandt *et al.*, 2001). Daher wurde untersucht,

ob IFN- γ mRNA ähnlich TNF- α mRNA durch Stress signifikant hochreguliert wird. Die Messungen zeigen, dass Stress keinen Einfluss auf die Expression von IFN- γ mRNA hat (Abbildung 7).

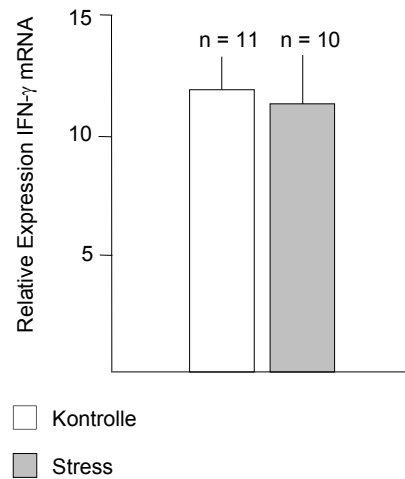


Abbildung 7: **IFN- γ mRNA in Stress und Kontrolle**

Keine Veränderung in der Menge an IFN- mRNA nach Stressexposition.

3.2.3 Die Beeinflussung der mRNA-Expression von IL-12 durch Stress

IL-12 ist ein wichtiges Zytokin, welches die Entwicklung von T-Zellen zu Th₁-Zellen reguliert. Daher ist interessant, ob Interleukin 12 eine Rolle in der Entstehung des TNF- α dominanten Milieus nach Stressexposition spielt. Das IL-12 p70 Protein setzt sich aus zwei verschiedenen Ketten zusammen. Zum einen besteht IL-12 p70 aus der IL-12 p40- und zum anderen aus der IL-12 p35-Kette (Wolf *et al.*, 1991). Es wird die 10fache Menge an IL-12 p40 im Vergleich zum IL-12 p35 exprimiert. Aufgrund dieser Konstellation kann angenommen werden, dass IL-12 p35 die Menge an IL-12 p70 Protein reguliert. Biologisch aktiv ist allein das komplette IL-12 p70-Protein. Aus diesen Gründen ist die mRNA-Expression beider IL-12-Ketten untersucht worden. Überraschenderweise stellte sich heraus, dass Stress die Expression von IL-12 p40 um das 1,2fache herunterreguliert (Abbildung 8 A). Im Gegensatz dazu induziert Stress die Expression von IL-12 p35 mRNA um das 2,8fache (Abbildung 8 B). Man könnte nun argumentieren, dass der Anstieg von IL-12 p35 eine vermehrte Bildung von IL-12 p70 trotz der geringeren IL-12 p40 Menge nach sich ziehen müsste. Es ist aber wichtig, sich zu vergegenwärtigen, dass IL-12 p40 in einer 10fachen Menge translatiert wird, und daher eine um das 1,2fach niedrigere Menge an IL-

IL-12 p40 die Menge an IL-12 p70 entscheidend beeinflusst. Der konsequenterweise zu erwartende Anstieg von IFN- γ durch eine erhöhte Menge an IL-12 p70 unter Stress blieb aus.

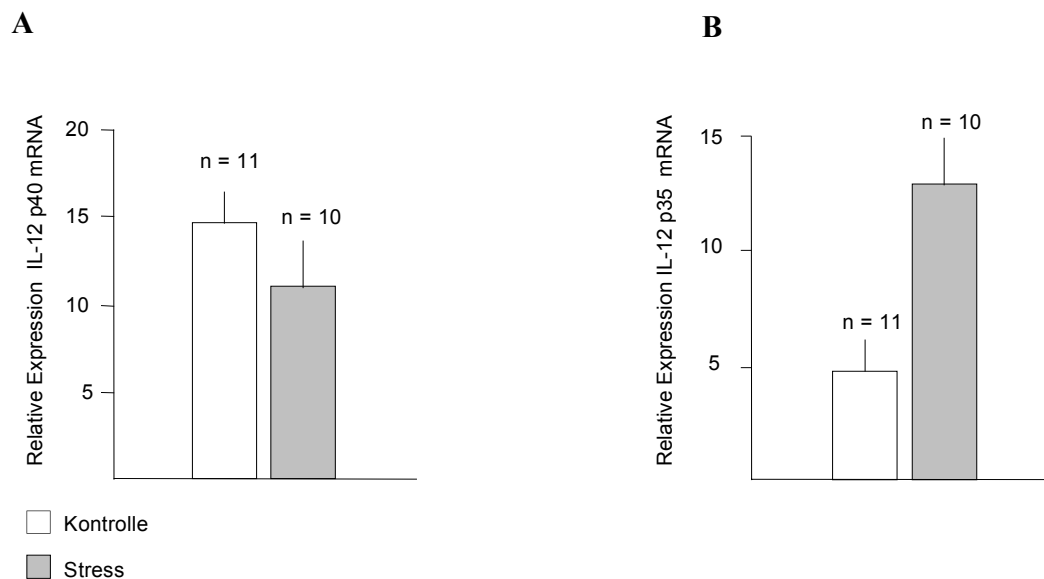


Abbildung 8: **IL-12 p40 und IL-12 p35 in Stress und Kontrolle**

A: Die Stressexposition der trächtigen Mäuse reguliert die Expression von IL-12 p40 um das 1,2fache herunter.

B: Die Stressexposition der trächtigen Mäuse reguliert die Expression von IL-12 p35 um das 2,8fache herauf.

3.2.4 Das Verhältnis der Abortrate zu der quantitativen Menge an Zytokinen

Ob des Anstieges von TNF- α nach Applikation von Stress wurde die Möglichkeit eines Zusammenhanges zwischen der Menge an TNF- α und der Resorptionsrate untersucht. Die Berechnung ergab, dass es einen engen Zusammenhang zwischen der Menge an TNF- α und der Resorptionsrate gibt ($r = 0,611$; $p < 0,05$; Abbildung 9) und dass dieser nach der Applikation von Stress noch eindeutiger ist ($r = 0,817$; $p < 0,05$; die Daten sind grafisch nicht dargestellt).

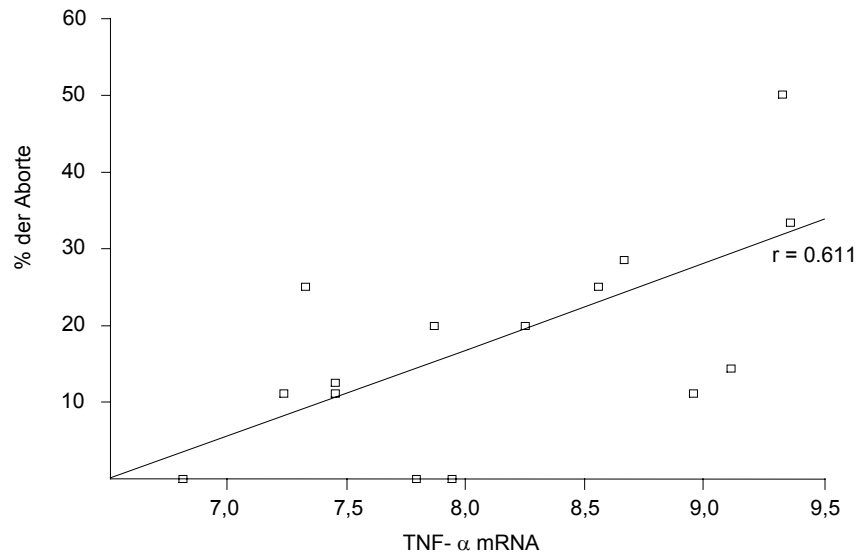


Abbildung 9: **Zusammenhang zwischen der Abortrate in Prozent und der Menge an exprimierter TNF- α mRNA**

Es zeigt sich eine positive Korrelation zwischen der Menge an TNF- α mRNA und dem Prozentsatz an Resorptionen bei einem Korrelationskoeffizienten von $r = 0.611$.

Im Gegensatz dazu zeigt IFN- γ keine Beziehung zu der Resorptionsrate (Abbildung 10).

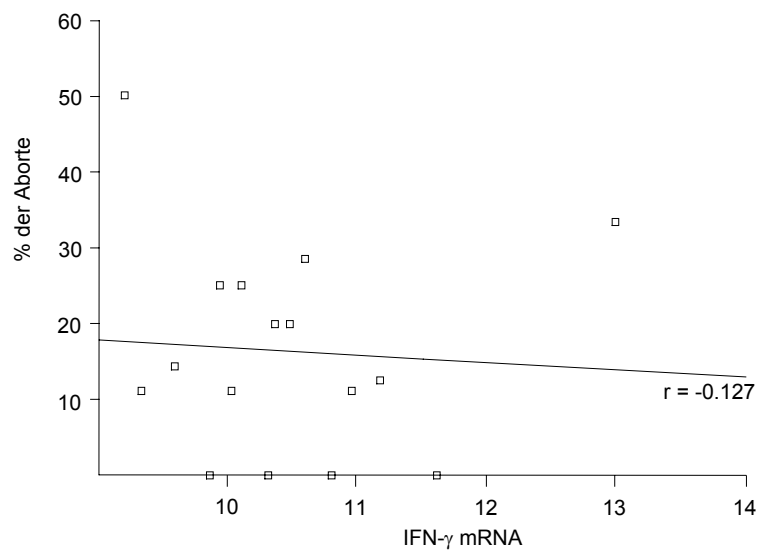


Abbildung 10: **Zusammenhang zwischen der Abortrate in Prozent und der Menge an exprimierter IFN- γ RNA**

Es zeigt sich keine Korrelation zwischen der Menge an IFN- γ und dem Prozentsatz an Resorptionen.

Ebenfalls lassen IL-12 p40 ($r = 0.24$) und IL-12 p35 ($r = -0.29$) keinen Zusammenhang zu dem Anteil an Resorptionen erkennen (Abbildung 11 und Abbildung 12).

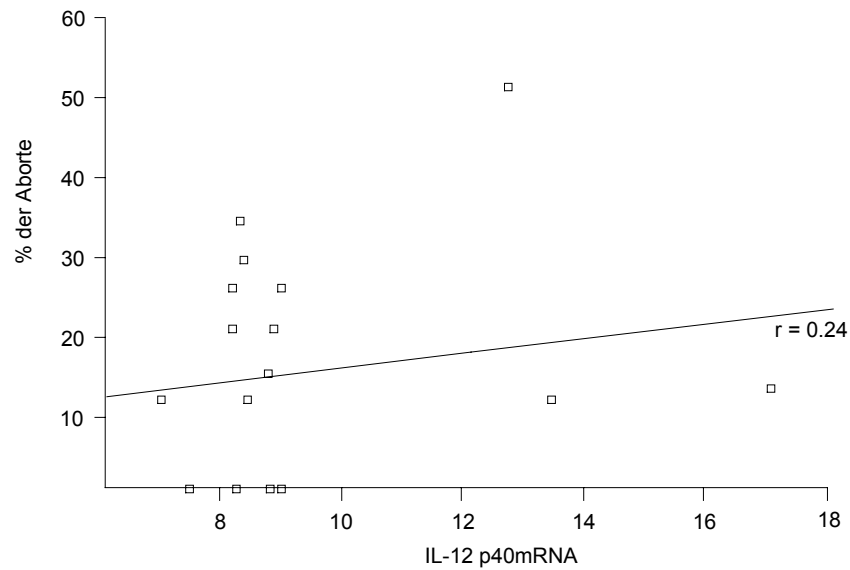


Abbildung 11: **Zusammenhang zwischen der Abortrate in Prozent und der Menge an exprimierter IL-12 p40 mRNA**
Es zeigt sich keine Korrelation zwischen der Menge an IL-12 p40 und dem Prozentsatz an Resorptionen.

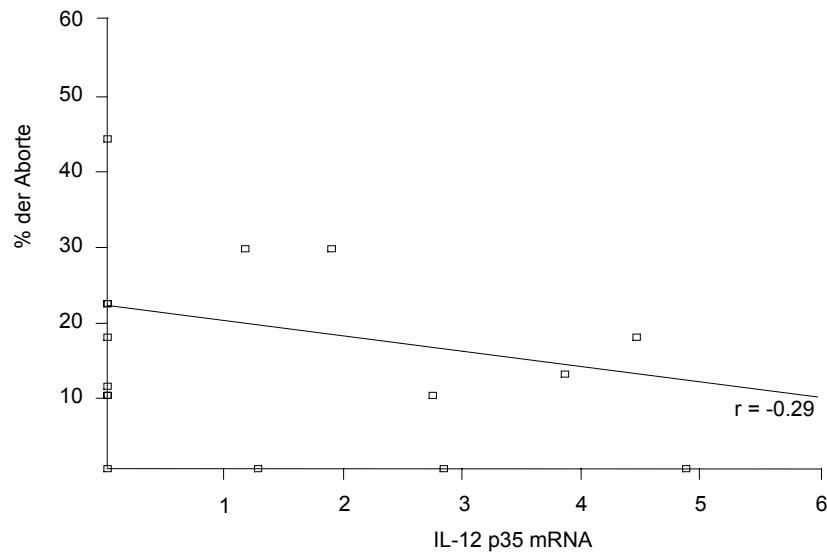


Abbildung 12: **Zusammenhang zwischen der Abortrate in Prozent und der Menge an exprimierter IL-12 p35 mRNA**
Es zeigt sich keine Korrelation zwischen der Menge an IL-12 p35 und dem Prozentsatz an Resorptionen.

3.3 Das Zytokinprofil nach der Injektion von IL-12

Die Frage ist, ob IL-12 als T-zellaktives Zytokin eine Th₁-Immunantwort in der Maus induzieren kann, die dann zu einem Anstieg der Abortrate führt. Nach der Injektion von IL-12 ergaben die Messungen einen Anstieg von IFN- γ mRNA um das 9,5fache (Abbildung 13). Interessanterweise nahm das injizierte, rekombinante IL-12 auch Einfluss auf die Expression von TNF- α : Nach der Injektion stieg die Expression von TNF- α mRNA um das 8,8fache (Abbildung 13). Nach der Stimulation durch IL-12 bestand folglich eine vergleichbare Zytokinkonstellation mit gleichzeitiger Präsenz von hohen Mengen an TNF- α und IFN- γ , wie bei der simultanen Injektion beider Zytokine:

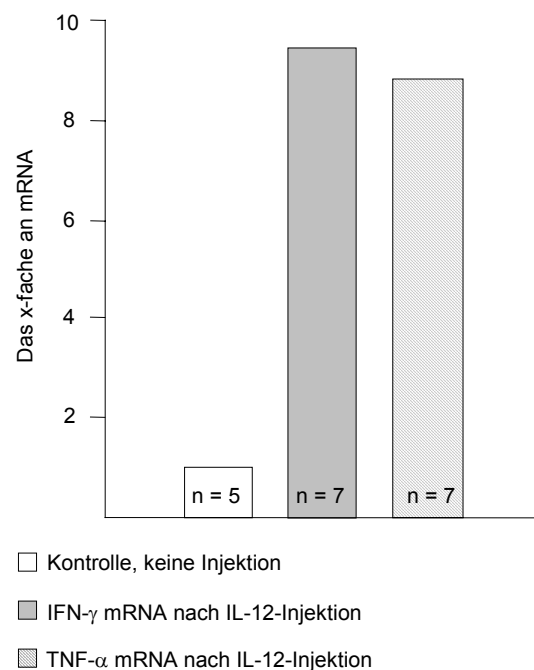


Abbildung 13: **Zytokinregulation nach der Injektion von IL-12 p70**

Deutlicher Anstieg von TNF- α und IFN- γ nach der Injektion von rekombinanten IL-12 p70.

3.4 Der Vergleich der Expression von fgl2 mRNA bei Stress und nach Injektion von IL-12

Die In-situ-Hybridisierung zeigt histologisch die Lokalisation der fgl2 mRNA im Uterus von CBA/J-Mäusen am Tag 13,5 der Trächtigkeit (Abbildung 14).

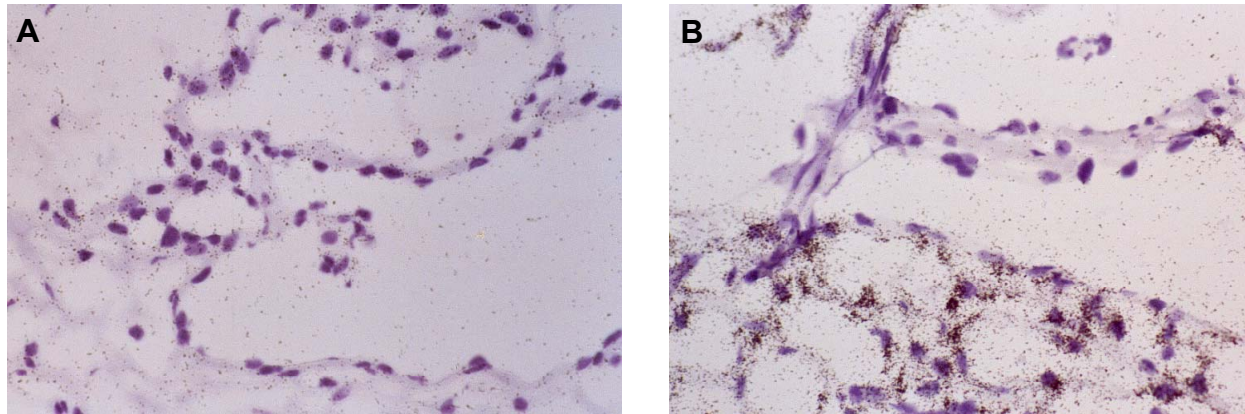


Abbildung 14: **In-situ-Hybridisierung für fgl2 mRNA im Uterus eines CBA/J-Weibchen am Tag 13,5 der Trächtigkeit** (A) zeigt die Sense-Probe und (B) zeigt die fgl2 mRNA positive Antisense-Probe.

Um die Rolle von fgl2 in Stress-vermittelter, physiologisch induzierter Resorption im Vergleich zu Zytokin-induzierten Aborten zu ermitteln, ist die Menge an fgl2 mRNA im Uterus gemessen worden. Die fgl2 mRNA-Menge nach der Stressstimulation war gegenüber den Kontrolltieren um das 3fache verringert. Die Injektion von IL-12 p70 induzierte einen Anstieg von fgl2 mRNA um das 3fache (Abbildung 15 A). Kein Zusammenhang konnte zwischen Fgl2 mRNA und der Resorptionsrate in der Stress- oder Kontrollgruppe festgestellt werden (Abbildung 15 B).

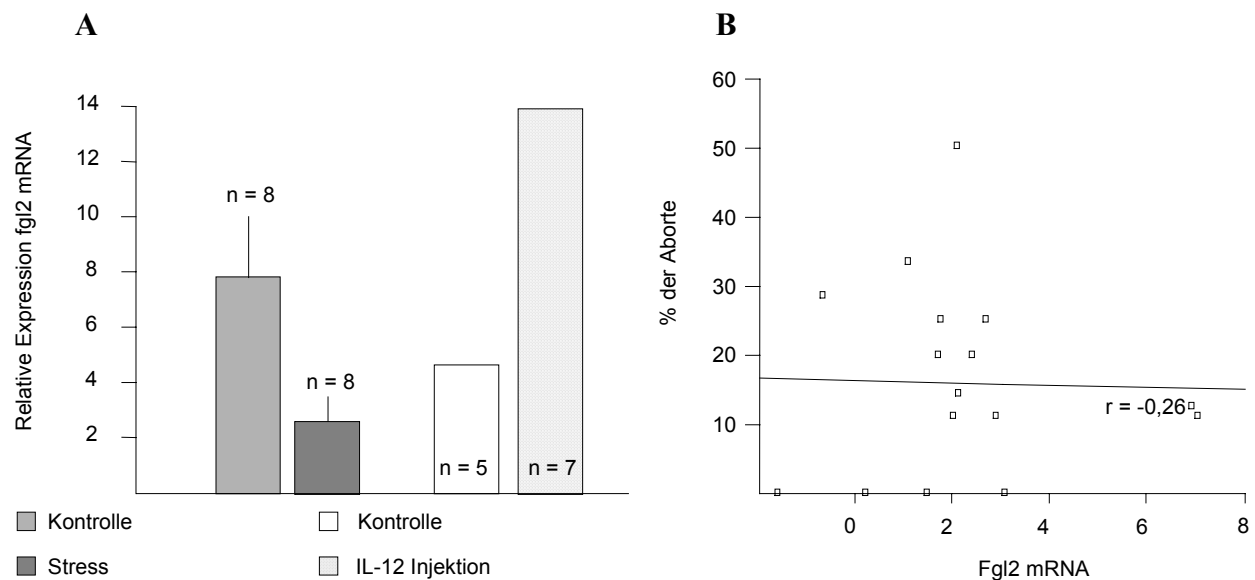


Abbildung 15: **Fgl2 mRNA-Expression bei stress-induziertem und inflammatorisch-induziertem Abort**

A: Fgl2 mRNA nach Stress und nach Injektion von IL-12: Fgl2 mRNA ist nach der Applikation von Stress (Tag 5,5) am Tag 13,5 der Trächtigkeit um das 3fache niedriger, wohingegen die Stimulation mit IL-12 p70 fgl2 mRNA auf das Dreifache erhöht.

B: Zusammenhang zwischen fgl2 und der Anzahl an Aborten: Es ist kein Zusammenhang zwischen der Menge an fgl2 mRNA und der Höhe der Resorptionen erkennbar.

Es zeigte sich aber, dass die Menge an TNF- α mRNA in einem negativen Zusammenhang mit der Menge an fgl2 mRNA steht (Abbildung 16). Es gab keine statistisch eindeutige Beziehung zwischen fgl2 mRNA und IFN- γ mRNA (Abbildung 17).

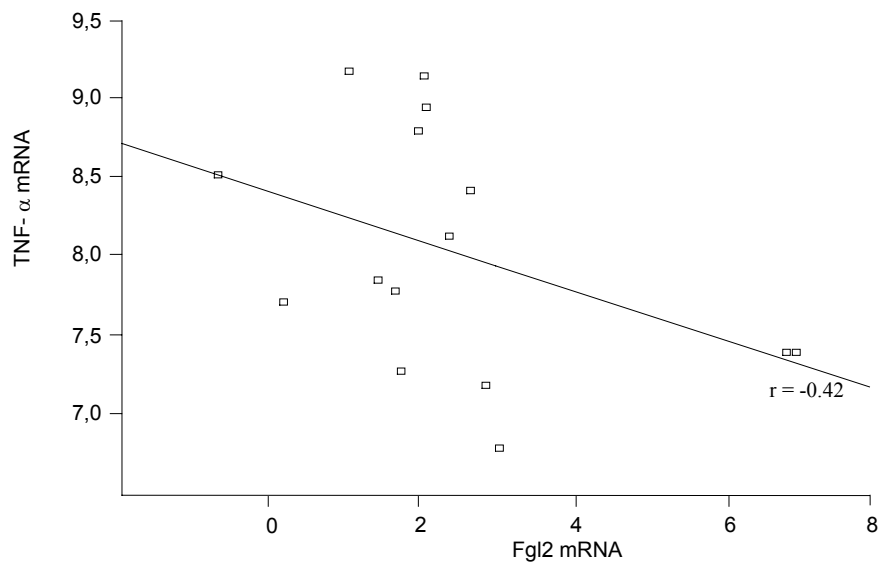


Abbildung 16: **Zusammenhang zwischen der Menge an TNF- α und der Menge an fgl2 mRNA**

Es zeigt sich keine signifikante Korrelation zwischen der Menge an TNF- α und der Menge an fgl2 mRNA, als Tendenz lässt sich ein negativer Zusammenhang zwischen den beiden Parametern erkennen.

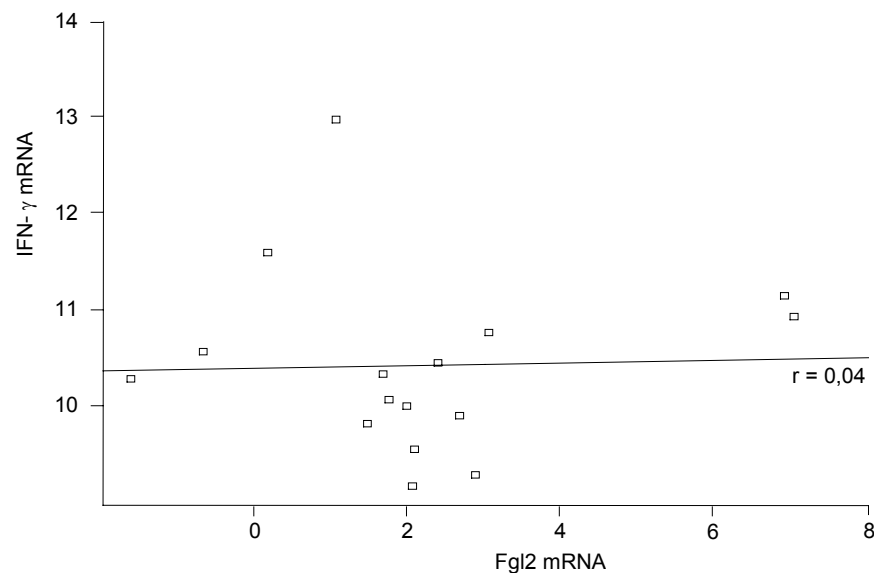


Abbildung 17: **Zusammenhang zwischen der Menge an IFN- γ mRNA und der exprimierten Menge an fgl2 mRNA**

Es zeigt sich keine Korrelation zwischen der Menge an IFN- γ und der Menge an fgl2 mRNA.

3.5 Die Induktion von Apoptose durch Stress und IL-12 im Mausmodell

Die schwangerschaftsgefährdende Wirkung von Th₁-Zytokinen kann einerseits durch die Initiation von Gerinnung, andererseits durch die Provokation von Zelluntergang vermittelt sein. Ob Stress durch freigesetztes TNF- α die abortogene Wirkung über Induktion von Apoptose, den programmierten Zelluntergang, verursacht, sollte durch eine Analyse der apoptotischen Aktivität im Uterusgewebe nach Stressexposition mittels TUNEL-Färbung bearbeitet werden. Die Applikation von Stress erhöhte die Häufigkeit von Apoptose deutlich (Abbildung 18). IL-12 induziert einerseits die Expression von fgl2 mRNA, gleichzeitig ist eine erhöhte Inzidenz an Apoptose in der Dezidua von IL-12 injizierten Tieren zu beobachten (Abbildung 18). TNF- α ist in der Literatur als Vermittler von Apoptose beschrieben worden (Yui *et al.*, 1994).

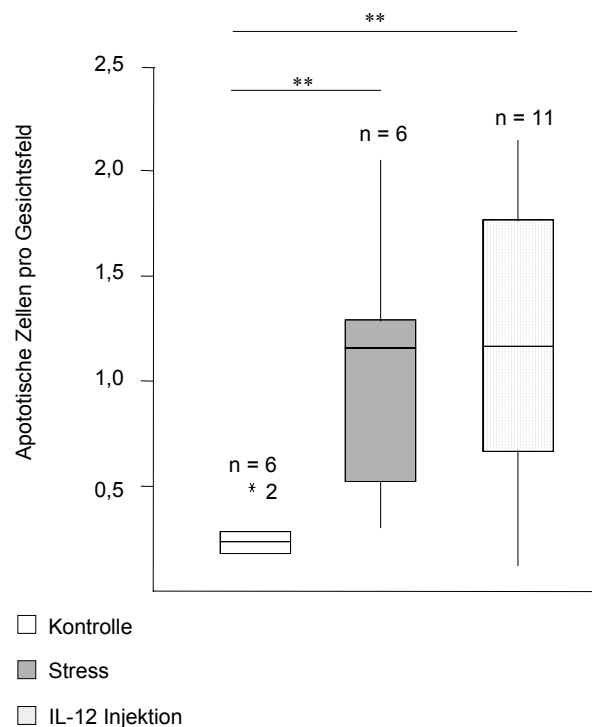


Abbildung 18: **Apoptose nach Stress und nach IL-12-Injektion**

Stressstimulation und IL-12-Stimulation erhöhen das Auftreten von Apoptose im Uterus von CBA/J Weibchen.

3.6 Die Expression von TNF- α im ersten Trimenon und dritten Trimenon

Der immunologisch regulierten Prothrombinase fgl2 und deren beschriebene Expressionserhöhung bei Schwangerschaftskomplikationen müsste eine Th₁-Immunantwort zugrunde liegen. Zur Überprüfung dieser Immunkonstellation wurde TNF- α ausgewählt, weil die vorangegangenen Tierversuche in beiden Abortkonstellationen übereinstimmend eine erhöhte Expression an TNF-

α mRNA gezeigt haben. Viele Publikationen deuten auf eine vermehrte Expression von IFN- γ mRNA hin, so dass im humanen Spontanabort von der Zytokinkonstellation TNF- α + IFN- γ \uparrow ausgegangen werden kann. Eine In-situ-Hybridisierung an der gleichen Patientinnenkohorte hat in einem vorherigen Versuchsaufbau eine erhöhte Expression an TNF- α mRNA bei Spontanabort und eine gleichzeitig vermehrte Stresswahrnehmung berichtet (Arck *et al.*, 2001). Die lange Fixierung des Plazentagewebes in Formaldehyd 37% bei der Routineaufbereitung des Gewebes durch die Pathologie ließ den Nachweis von mRNA mit der hochanfälligen In-situ-Hybridisierung in den Präeklampsie-Plazenten nicht zu. Der Nachweis von TNF- α in Präeklampsie erfolgte daher durch den Proteinnachweis mit Immunhistochemie. Präeklampsie war mit einer erhöhten Menge an TNF- α Protein verbunden. Die semi-quantitative Analyse belegt, dass eine deutlich höhere Färbungsintensität der Trophoblasten für TNF- α in Präeklampsie zu beobachten war (Abbildung 19). Abbildung 20 zeigt die Färbung von normalen, 3.-Trimester-Zotten für TNF- α Protein, wohingegen die Abbildung 21 die Immunhistochemie für TNF- α in einer 3.-Trimester-Plazenta bei Präeklampsie demonstriert. Tabelle 1 verdeutlicht die Gesamtauswertung der Immunhistochemie für TNF- α Protein bei normalen Schwangerschaftsverlauf versus Präeklampsie.

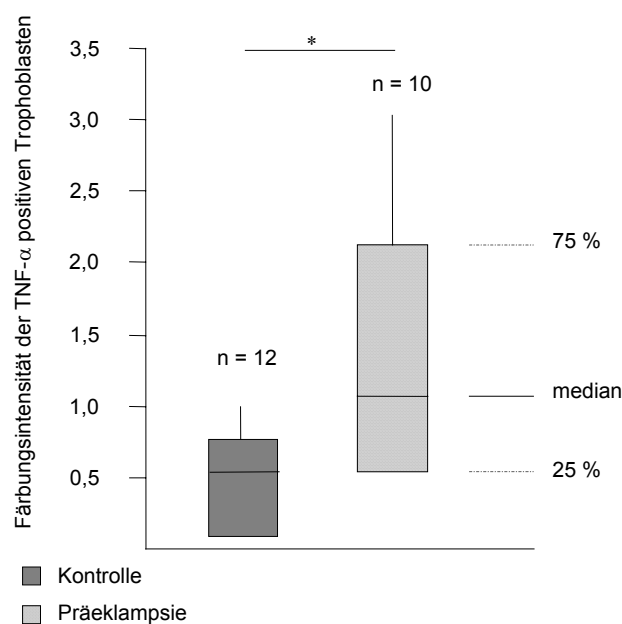


Abbildung 19: **TNF- α Expression in den Gefäßen bei Präeklampsie**

Semi-quantitative Analyse der Immunhistochemie für TNF- α Protein an den Gefäßen in Präeklampsie und Kontrollen.

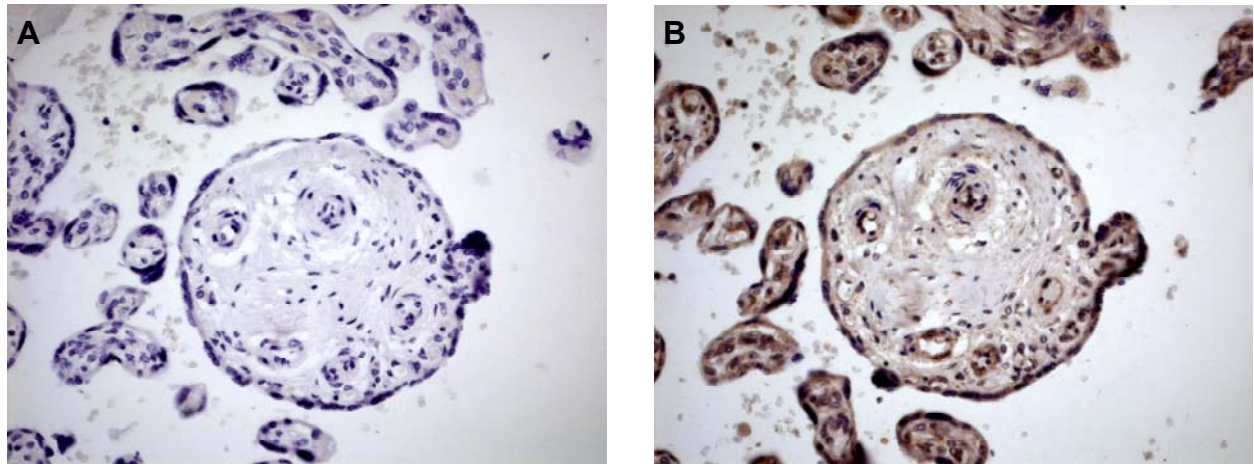


Abbildung 20: **Immunhistochemie für TNF- α in 3.-Trimester-Plazenta bei normalem Schwangerschaftsverlauf**
(A) zeigt die IgG-Kontrolle und (B) zeigt die Färbung für TNF- α Protein.

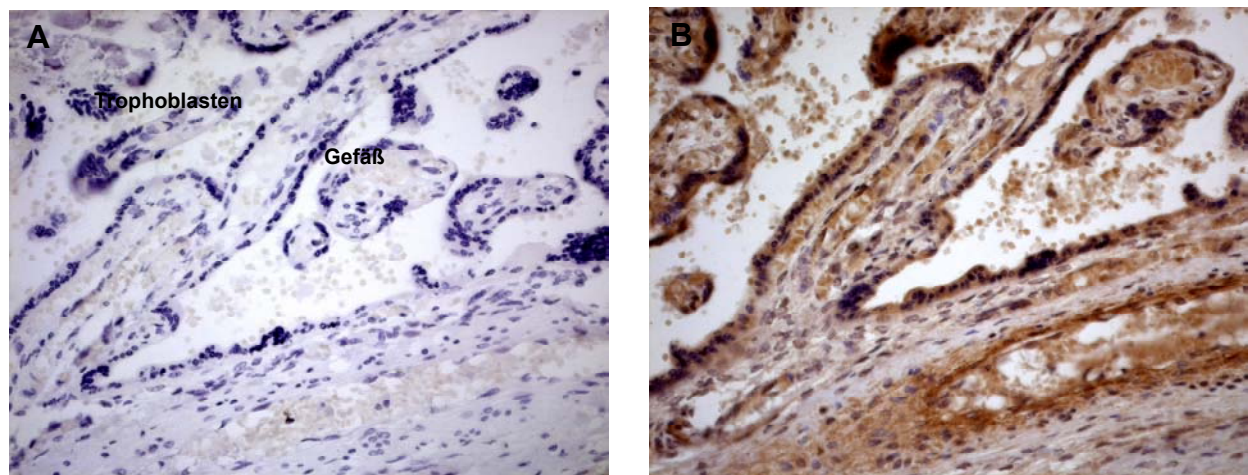


Abbildung 21: **Immunhistochemie für TNF- α in 3.-Trimester-Plazenta von Präeklampsie-Patientinnen**
(A) zeigt die IgG-Kontrolle und (B) zeigt die Färbung für TNF- α Protein.

Die spezifische Analyse der TNF- α Protein-positiven Zellen in Präeklampsie zeigt die Tabelle 1:

Gewebeursprung	Endothel	Trophoblast	plazentare Makrophagen
PE (n = 10)	+/++	+	+/++
Kontrolle (n = 12)	+	+/-	+/++

Tabelle 1: **Immunhistochemie für TNF- α in 3.-Trimester-Plazenta bei normalem Schwangerschaftsverlauf und von Präeklampsie-Patientinnen**

Vermehrte Expression von TNF- α Protein in Endothelzellen und Trophoblasten bei Präeklampsie (PE) im Vergleich zu einem normalen Schwangerschaftsverlauf. Kein Unterschied in der Expression von TNF- α Protein in Trophoblastzellen und plazentaren Makrophagen.

3.7 Die Expression von fgl2 mRNA und fgl2 Protein in humanem Plazentagewebe

3.7.1 Das erste Trimenon

Abbildung 22 zeigt die mittels In-situ-Hybridisierung gewonnenen Daten.

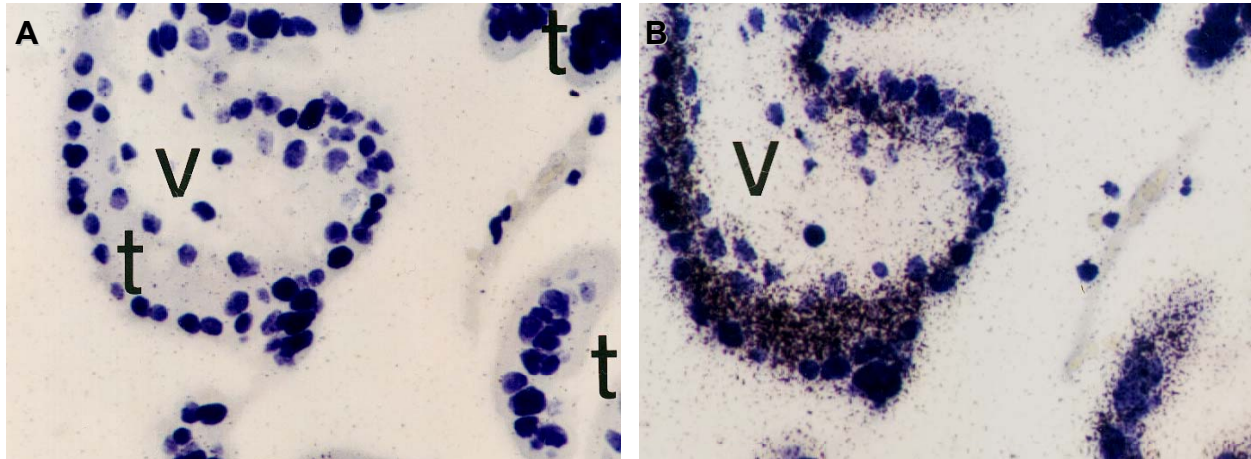


Abbildung 22: **In-situ-Hybridisierung für fgl2 mRNA 1.-Trimester-Zotte**

(A) zeigt die Sense-Kontrolle und (B) zeigt die Antisense-Färbung für fgl2 mRNA.

Es sind Plazentazotten mit der zweizelligen Trophoblastenschicht – bestehend aus den Syncytiotrophoblasten und den Cytotrophoblasten – welche charakteristisch für das erste Trimenon sind, dargestellt. Die In-situ-Hybridisierung wurde unter Verwendung einer ^{35}S -markierten fgl2 mRNA-Sonde durchgeführt. Bei beiden abgebildeten Zotten zeigt sich eine typische, schwarze Markierung der Trophoblastenschicht in der Antisense-Probe, wobei die mRNA-Probe spiegelbildlich der fgl2 mRNA-Sequenz ist. In der Negativkontrolle, der Sense-Probe, in der die Probe identisch mit der fgl2-mRNA Sequenz ist, zeigt sich kein positives Signal. Der Trophoblast weist auch in der Immunhistochemie positive Signale (braun) für fgl2 Protein auf (Abbildung 21).

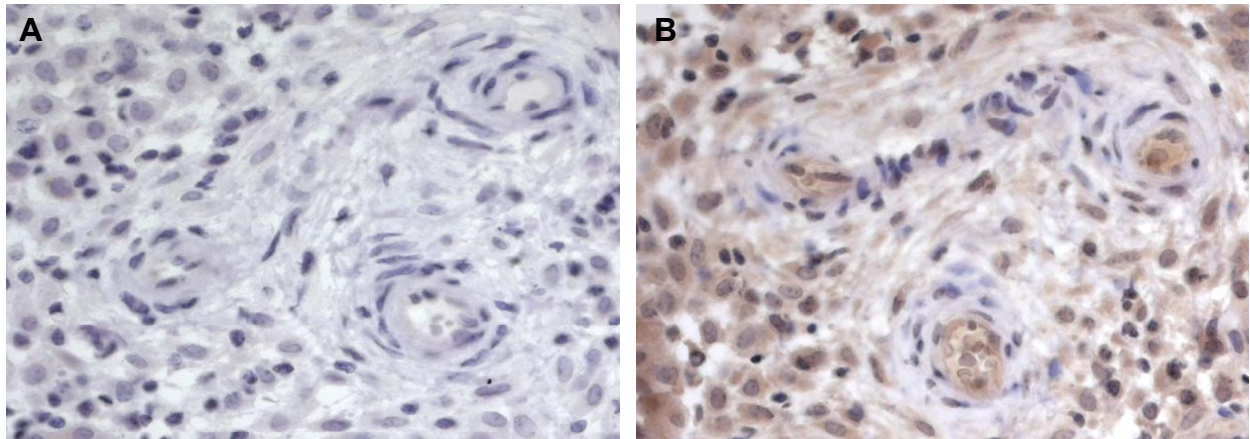


Abbildung 23: **Immunhistochemie für fgl2 in 1.-Trimester-Plazenta bei normalem Schwangerschaftsverlauf**

(A) zeigt die IgG-Kontrolle und (B) zeigt die Färbung für fgl2 Protein sowie einen repräsentativen Gefäßanschnitt.

Diese Ergebnisse belegen erstmals, dass fgl2 mRNA und fgl2 Protein in humanen Trophoblastzellen exprimiert werden, insbesondere wenn ein Spontanabort erfolgt ist. Die Zahl der fgl2 positiven Gefäße an der Gesamtzahl der Gefäße war erhöht, wenn ein Spontanabort stattgefunden hatte (Abbildung 24).

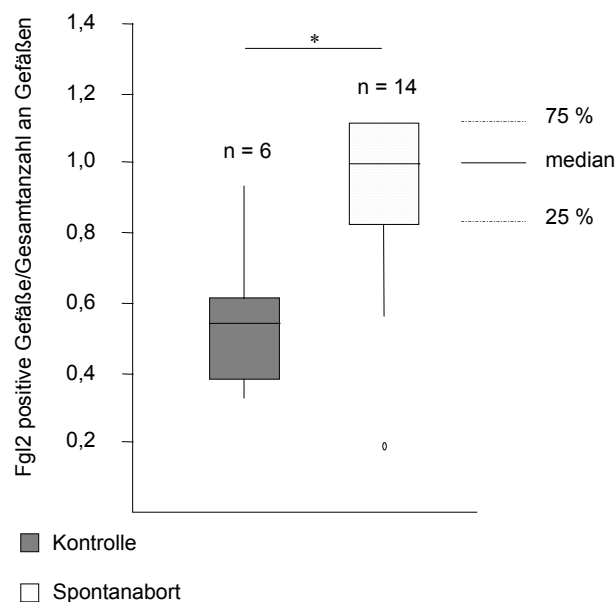


Abbildung 24: **fgl2 Protein-Expression in Endothelzellen von Gefäßen im ersten Trimenon**

Semi-quantitative Analyse der Immunhistochemie für fgl2 an den Gefäßen in der Dezidua basalis von Kontrolle und Spontanabort.

Die semi-quantitative Auswertung der fgl2-Expression der zottären Trophoblasten zeigt, dass die Patientinnen mit einem Abort eine höhere fgl2-Expression aufweisen als Patientinnen mit einer elektiven Schwangerschaftsbeendigung (Abbildung 25).

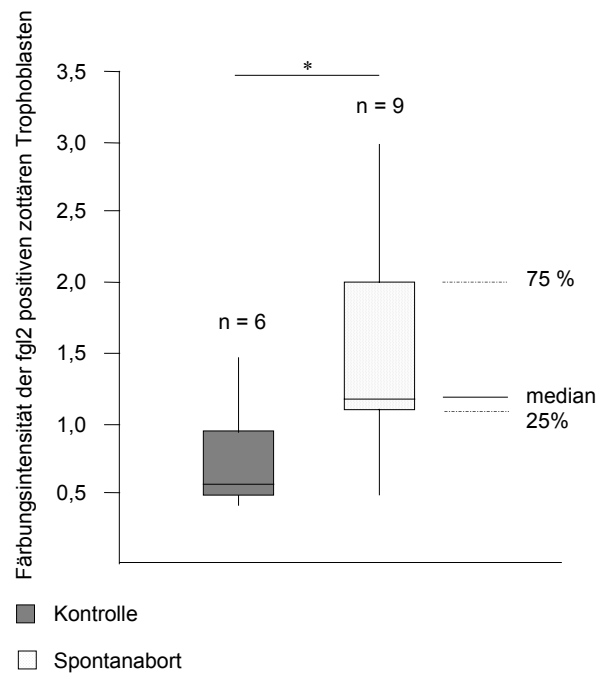


Abbildung 25: **fgl2 Protein-Expression in Trophoblasten des ersten Trimenon**

Semi-quantitative Analyse der Immunhistochemie für fgl2 an den Trophoblastzellen der Dezidua basalis in Kontrolle und Spontanabort

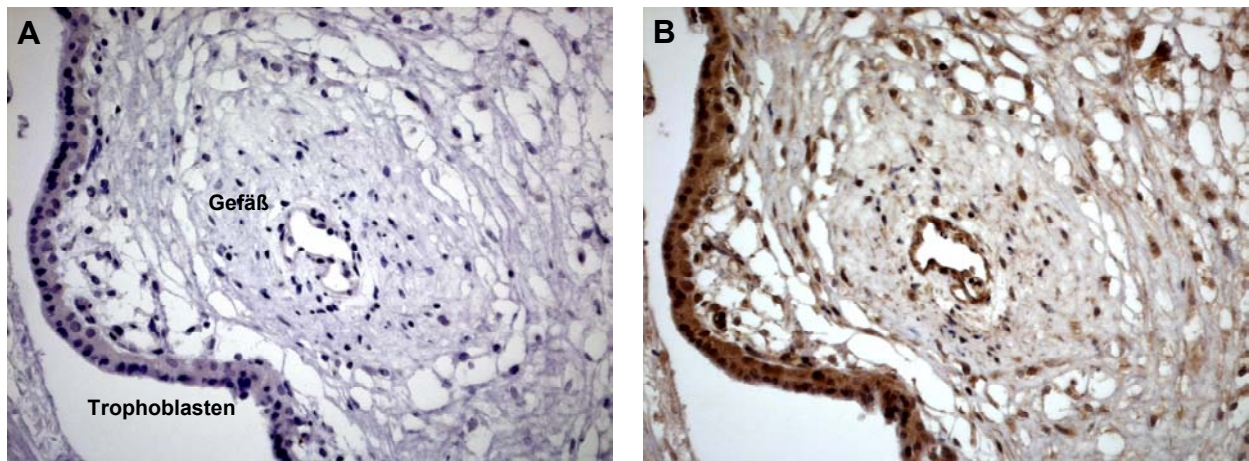


Abbildung 26: **Immunhistochemie für fgl2 in 1.-Trimester-Plazenta von Abort-Patientinnen**

(A) zeigt die IgG-Kontrolle und (B) zeigt die Färbung für fgl2 Protein sowie einen repräsentativen Gefäßanschnitt.

3.7.2 Das dritte Trimenon

Fgl2 Protein konnte gleichfalls in Plazentagewebe aus dem dritten Trimester entdeckt werden. Wegen der langen Fixierung des Gewebes (siehe oben) besteht kein direkter Nachweis von fgl2 mRNA-Expression in Plazentagewebe aus dem dritten Trimester. Die Intensität der fgl2-Immunhistologie ist quantifiziert für die Plazentaprobe von Präeklampsie-Patientinnen und unkomplizierten Schwangerschaften (Tabelle 2).

Gewebeursprung	Endothel	Trophoblast	plazentare Makrophagen
PE (n = 12)	+	+	+ / ++
Kontrolle (n = 12)	+ / -	+ / -	+

Tabelle 2: **Immunhistochemie für fgl2 in 3.-Trimester-Plazenta bei normalem Schwangerschaftsverlauf und bei Präeklampsie-Patientinnen**

Vermehrte Expression von fgl2 Protein in Endothelzellen, Trophoblasten und Makrophagen bei Präeklampsie-Patientinnen (PE) im Vergleich zu einem normalen Schwangerschaftsverlauf.

Tabelle 2 fasst die Daten der Immunhistologie zusammen und zeigt eine erhöhte fgl2 Protein-Expression in Trophoblasten, Makrophagen (Hofbauer Zellen) und Zottenendothel, wenn das Plazentagewebe und die angrenzenden Deziduagewebe von einer Patientin mit Präeklampsie stammte. Abbildung 27 zeigt die Analyse der fgl2 Expression der Gefäße und belegt die erhöhte Anzahl fgl2 positiver Gefäße an der Gesamtzahl der Gefäße, wenn eine Präeklampsie bestand.

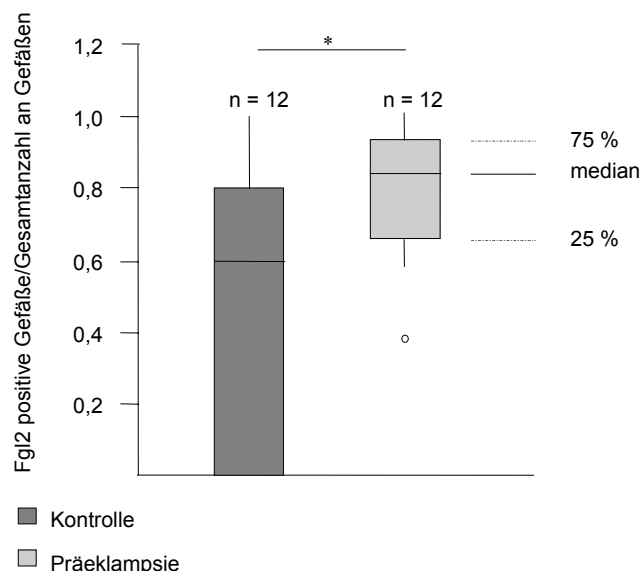


Abbildung 27: **Expression von fgl2 Protein in Endothelzellen im dritten Trimenon**

Semi-quantitative Analyse der Immunhistochemie für fgl2 an den Gefäßen in Präeklampsie und Kontrollen.

Die nachfolgende Abbildung 28 zeigt reife Zotten einer Plazenta im dritten Trimenon bei normalem Schwangerschaftsverlauf. Vereinzelt exprimieren die Trophoblastzellen fgl2 Protein (Abbildung 26 B). In Abbildung 29 ist die Plazenta einer Präeklampsie-Patientin dargestellt, wobei die Trophoblasten homogener fgl2 Protein exprimieren.

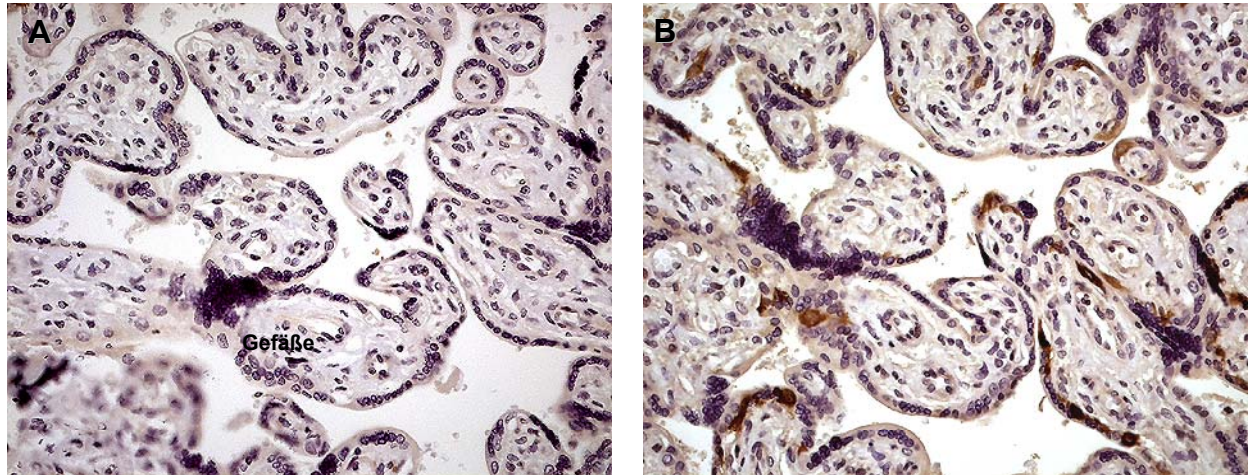


Abbildung 28: **Immunhistochemie für fgl2 in 3.-Trimester-Plazenta bei normalem Schwangerschaftsverlauf**
(A) zeigt die IgG-Kontrolle und (B) zeigt die Färbung für fgl2 Protein.

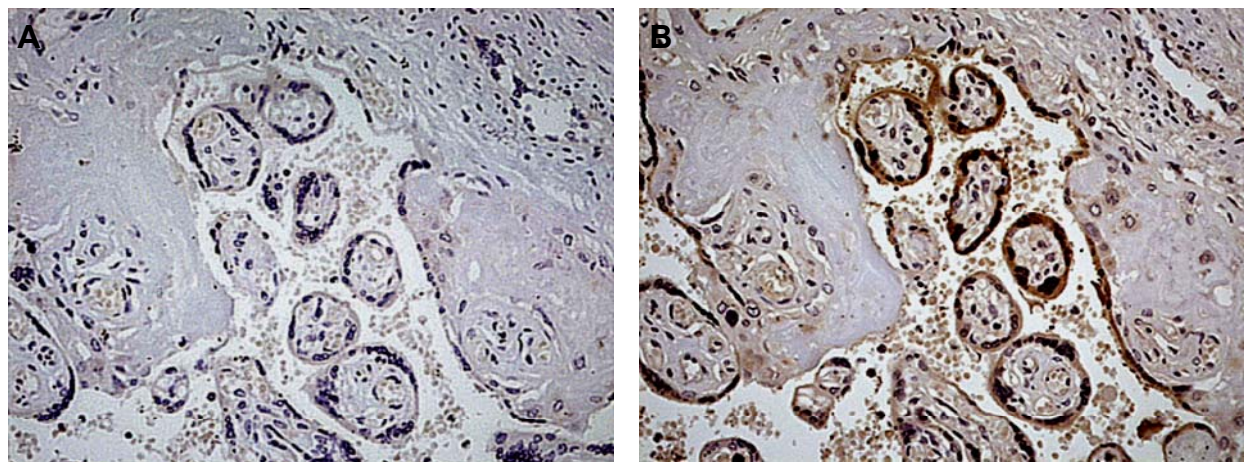


Abbildung 29: **Immunhistochemie für fgl2 in 3.-Trimester-Plazenta von Präeklampsie-Patientinnen**
(A) zeigt die IgG-Kontrolle und (B) zeigt die Färbung für fgl2 Protein.

Mit dieser Beobachtung übereinstimmend konnten beeindruckende Ablagerung von Fibrin in den Plazentaprobe der Präeklampsie-Patientinnen im Vergleich zu Plazentaprobe bei unkomplizierter Schwangerschaft beobachtet werden.

3.8 Apoptose in Präeklampsie und Spontanabort

Th₁-Zytokine, insbesondere TNF- α , sind in der Lage programmierten Zelltod, in Form einer Apoptose, auszulösen. Die Untersuchung der apoptotischen Signale im ersten Trimenon und im dritten Trimenon ergaben, dass sowohl in der Dezidua als auch in Präeklampsie-Plazenten eine deutlich höhere Inzidenz an Apoptose zu beobachten war (Abbildung 30).

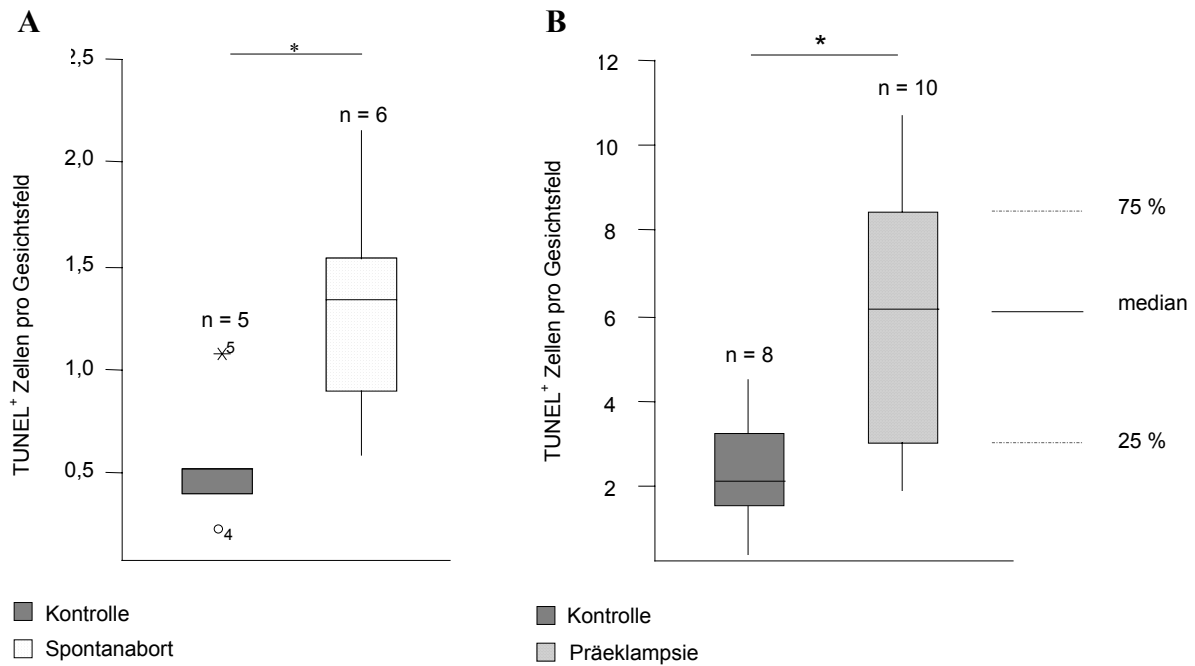


Abbildung 30: **Apoptose im ersten und dritten Trimenon**

A: Semi-quantitative Analyse der apoptotischen Signale im Spontanabort.

B: Semi-quantitative Analyse der apoptotischen Signale bei Präeklampsie.

In Abbildung 31 ist die Apoptose in einer Plazenta im dritten Trimester dargestellt.

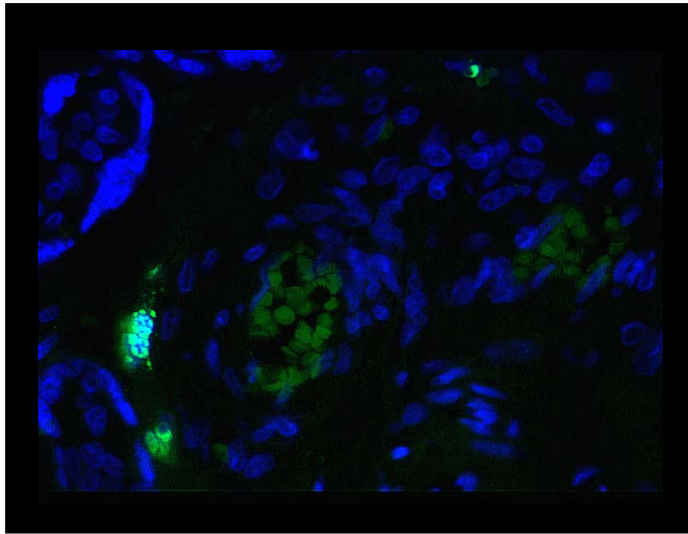


Abbildung 31: **Apoptose im dritten Trimenon**

Die Zellkerne sind blau angefärbt, wobei die apoptotischen Fragmente grünfluoreszieren.

4 Diskussion

Die Daten aus dem Mausmodell sind in der Tabelle 3 kurz zusammengefasst:

	Resorption	TNF- α	IFN- γ	IL-12 p35	IL-12 p40	Fgl2
Stress	↑	↑	-	↑	-	↓
IL-12-Injektion	↑	↑↑	↑↑	ND	ND	↑

Tabelle 3: Überblick über das Zytokinprofil im Mausmodell nach Stress und IL-12-Injektion

Stress bewirkte einen Anstieg der Resorptionsrate und von TNF- α mRNA, wobei fgl2 mRNA vermindert exprimiert wurde. Stress zeigte keinen Einfluss auf die Expression von IFN- γ mRNA und IL-12 mRNA.

Die Injektion von IL-12 bewirkte einen Anstieg von TNF- α und IFN- γ mRNA sowie einen Anstieg von fgl2 mRNA.

Die Ausgangshypothese dieser Arbeit war das von Clark *et al.* 1998 und 1999 entwickelte Modell, welches die zytokinabhängige Stimulation der Prothrombinase fgl2 als einen Schlüsselschritt im murinen Abortgeschehen beschreibt. Einen Anstieg der Abortrate parallel mit einem Anstieg der Expression von fgl2 konnten Clark *et al.* nach der Ko-Injektion der Zytokine TNF- α und IFN- γ beobachten, dieser Effekt war mit gerinnungshemmender, pharmakologischer Therapie antagonisierbar. Nachfolgend eine grafische Übersicht des Modells von Clark *et al.*:

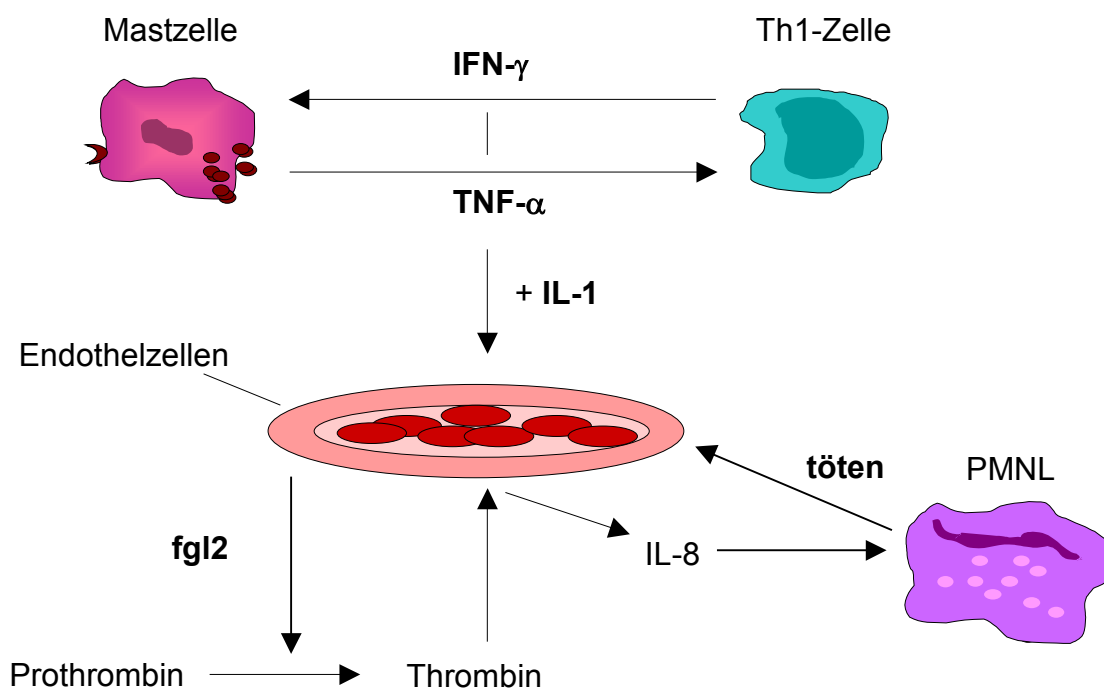


Abbildung 32: Hypothese

Durch simultane Applikation von TNF- α und IFN- γ am Tag 7,5 der Trächtigkeit werden immunkompetente Zellen, wie Mastzellen, spezifische T-Zellsubpopulationen und Makrophagen, aktiviert, wodurch ein inflammatorisches Milieu mit Produktion von Th₁-Zytokinen entsteht. Die Anwesenheit von TNF- α und IFN- γ sowie Interleukin-1 im Uterus stimuliert maternale Endothelzellen zur Produktion und Sekretion von fgl2. Wenn fgl2

von den maternalen Endothelzellen exprimiert wird, fungiert es als direkte Prothrombinase und wandelt Prothrombin in Thrombin um. Dieser Vorgang führt zu einem zur Gerinnung und erhöhter Bildung von Fibrin, zum anderen zur Aktivierung der Endothelzellen und zur erhöhten Produktion von IL-8 (in der Maus MIP-2). Die Anwesenheit von IL-8 wirkt chemotaktisch auf polymorphonukleare Leukozyten, die dann zu Zelluntergang und nekrotischem Gewebeerfall führen. „Klinisch“ zeigt sich das Bild einer gesteigerten Abortrate. Appliziert man gleichzeitig mit den Zytokinen gerinnungshemmende Medikamente wie Hirudin oder Heparin bleibt der deutliche Anstieg der Abortrate aus.

Aufgrund dieses Modells lautete die Arbeitshypothese, dass Stress sowie Interleukin-12 durch die Induktion einer Th_1 -Immunantwort in Abhängigkeit von fgl2 die Abortrate erhöhen. In beiden Mausmodellen konnte eine erhöhte Abortrate beobachtet werden, wobei beide Abortstimuli zu einem Anstieg an $TNF-\alpha$ mRNA geführt haben. Der Anstieg war nach der Injektion von IL-12 deutlicher als nach Stressexposition. $IFN-\gamma$ war erhöht nach der Applikation von IL-12, nicht aber nach der Applikation von Stress. Die Expression von fgl2 war durch die Injektion von IL-12 deutlich gesteigert, das Gegenteil – ein Abfall der Menge an fgl2 – war in den gestressten Tieren zu beobachten. Wie können diese Unterschiede erklärt werden?

Fgl2 wird von Endothelzellen und Makrophagen exprimiert, ebenso von Trophoblasten und einer nichtidentifizierten Population von Zellen, die in der Dezipua von CBA/J-Weibchen am Tag 8,5 der Trächtigkeit beschrieben wurden (Clark *et al.*, 2001). Der Promotor des fgl2-Genes enthält ein $IFN-\gamma$ -Responder-Element (Liu *et al.*, 2001). Obwohl keine dementsprechende Bindungsstelle für $TNF-\alpha$ existiert, ist für $TNF-\alpha$ die Fähigkeit beschrieben worden, den Effekt von $IFN-\gamma$ auf die Expression von fgl2 um das 2fache zu potenzieren (Clark *et al.*, 2001). Die erhöhten Werte für fgl2 in den IL-12 behandelten Mäusen sind konsistent mit den persistierend hohen Werten an $IFN-\gamma$ mRNA. Es sollte an dieser Stelle betont werden, dass der IL-12 Stimulus über mehrere Tage erfolgt ist und dass er am Tag 9,5 endete, wohingegen der Stressstimulus nur über 24 Stunden einwirken konnte und bereits am Tag 6,5 endete. Der IL-12-Stimulus an sich mag stärker als der Stress-Stimulus sein. Dies widerspricht nicht dem Befund erhöhter Werte von IL-12 p35 mRNA in gestressten Tieren. Allerdings führen erhöhte Werte von fgl2 in Trophoblasten und in der Dezipua nicht zwangsläufig zu einem Anstieg an Resorptionen. Nur ungefähr die Hälfte aller stark fgl2 exprimierenden Stellen zeigten in vorherigen Versuchen (Clark *et al.*, 1999; Clark *et al.*, 2000) einen Abort und dieser protektive Effekt könnte durch die gleichzeitige Expression von OX-2 (CD200) vermittelt sein, welches IL-10 und $TGF-\beta_2$ produzierende $\gamma\delta$ -T-Zellen im Uterus sowie IDO+-Makrophagen aktiviert. Die Behandlung mit $TNF-\alpha$ und $IFN-\gamma$ erhöhte deutlich die Expression von fgl2 und reduzierte gleichzeitig die Expression von CD200.

Es scheint möglich, dass die Expression von CD200 die Implantationen zu „retten“ vermag. Unter Berücksichtigung der Daten dieser Arbeit kann als möglich erachtet werden, dass überlebende Implantationen am Tag 13,5 in den IL-12 behandelten Tieren mit erhöhter Expression von TNF- α , IFN- γ und fgl2 mRNA auf die Anwesenheit von CD200 zurückzuführen sind. Die Applikation eines neutralisierenden Antikörpers für CD200 wäre dann mit einer sehr hohen Anzahl an Aborten verbunden, allerdings ist ein solches Experiment im Rahmen dieser Arbeit nicht erfolgt. Durch welche Mechanismen CD200 herunterreguliert wird, bleibt unbekannt, wobei Signale über TNF- α und Mitglieder der TNF- α Superfamilie (z. B. OX-40/OX-40Ligand) vermutet werden (Kjaergaard *et al.*, 2001).

Wie bereits in der Tabelle III zusammengefasst, steht die durch die einmalige Stressexposition evozierte Menge an TNF- α mRNA der Menge an TNF- α , die durch eine viertägige Injektion von IL-12 induziert wurde, gegenüber. Durch die kürzere Einwirkzeit des Stresses (24 Stunden) könnten gegenregulatorische Mechanismen nach der Applikation schneller aktiviert werden und über einen längeren Zeitraum wirken. Es wäre möglich, dass die Aktivierung von CD200 mit der konsequenten Stimulation von IL-10 und TGF- β 2 produzierenden $\gamma\delta$ -T-Zellen beginnend am Tag 8,5 ausreichend war, um fgl2 nach der Stressexposition deutlich herunterzuregulieren, im Einvernehmen mit dem beschriebenen Modell (Clark *et al.*, 1999). So könnte CD200 die inflammatorischen Komponenten im Abortgeschehen herunterregulieren, wodurch die Expression von fgl2 nicht mehr mit der Progression zur Resorption korrelieren müsste. Es wäre durchaus möglich, dass Stress und IL-12 unterschiedliche Entzündungsreaktionen hervorrufen, da Stress eher über das psychovegetative und neuroendokrine System das Immunsystem aktiviert, wohingegen IL-12 insbesondere nach Aktivierung von Makrophagen durch Mikroben bzw. durch Endotoxine (LPS) produziert wird. Stress, so konnte in Bioassays gezeigt werden, erhöht die Menge an bioaktivem TNF- α Protein im Uterus von CBA/J-Weibchen (Arck *et al.*, 1995; Arck *et al.*, 1997). Hohe Mengen an TNF- α könnten durch die Stimulation von vegetativen Nervenfasern bedingt sein, da vegetative Nervenfasern nach Stress das Neuropeptid Substanz P sezernieren. Über dessen Interaktion mit dem Neurokinase-1-Rezeptor auf Mastzellen käme es dann zur Degranulation von lokalen Mastzellen im Uterus mit Freisetzung großer Mengen an TNF- α (Markert *et al.*, 1998; Marx *et al.*, 1999; Joachim *et al.*, 2001). Ein solcher Effekt ist für IL-12 bis dato noch nicht beschrieben worden. Andere Studien haben einen deutlichen Anstieg von IFN- γ Protein in CD26 positiven Lymphozyten nach Stressexposition beschrieben (Hildebrandt *et al.*, 2001). Pro-abortive CD8⁺ T-Zellen können ebenfalls durch Stress aktiviert werden, so wie immunoprotektive CD8⁺ positive Zellen durch Stress inaktiviert werden können. Die eben erwähn-

ten immunoprotektiven Suppressorzellen scheinen vor dem Tag 8,5 aktiv zu sein, indem sie IL-10 produzieren und den Progesteron-induced Blocking Faktor sezernieren. Sie sind genau von den CD4⁺CD8⁻ $\gamma\delta$ T-Zellen zu unterscheiden, die zwar ebenfalls IL-10 zusätzlich aber auch noch TGF- β 2 produzieren und die die oben genannten Supressorzellpopulation ab Tag 8,5 der Trächtigkeit ersetzen (Clark *et al.*, 2001; Clark *et al.*, 1999). Der Verlust der Suppressorzellen ab dem Tag 8,5 in gestressten Tieren könnte dazu führen, dass geringe Mengen an TNF- α mit physiologischer Expression von IFN- γ eine suffiziente, obwohl vorübergehende, Produktion von erhöhten Werten an fgl2 mRNA am Tag 8,5 hervorrufen, die dann ausreichend wäre, zu diesem Zeitpunkt den Anstoß für einen Abort zu geben. Der Anti-Fgl2-Antikörper ist noch nicht dahingehend getestet worden, ob eine entsprechende Behandlung einen stressinduzierten Abort verhindern könnte.

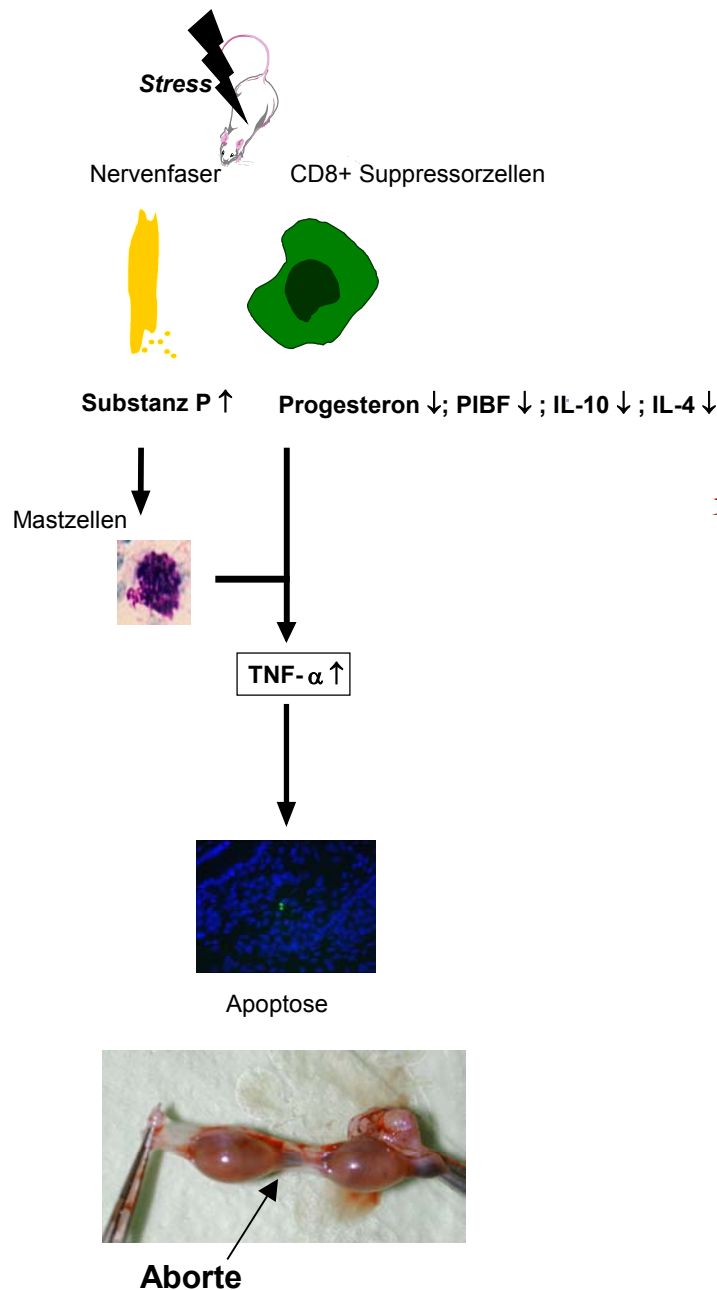
Das aus NK-Zellen entstammende IFN- γ hat den positiven Effekt, dass es die Schwangerschaft insofern unterstützt, als es die Umwandlung der Hochwiderstandsgefäße in Gefäße mit geringem Tonus und großer Volumenkapazität umwandelt und somit den während der Schwangerschaft benötigten gesteigerten Blutfluss zur Nahrung der wachsenden fetoplazentaren Einheit gewährleistet (Ashkar *et al.*, 2000). IFN- γ scheint auch an der Regulation von VEGF (vascular endothelial growth factor), einem wichtigen Angiogenesefaktor während der Schwangerschaft, beteiligt zu sein (Ashkar *et al.*, 2000). Eine schwangerschaftsgefährdende Rolle für IFN- γ in der Dezipua ist scheinbar von der Präsenz weiterer Th₁-Zytokine, wie z. B. TNF- α , und dem Mangel an protektiven Th₂/Th₃ Zytokinen wie IL-10 und TGF- β 2 abhängig (Clark *et al.*, 2001). Eine ausreichende Menge an TNF- α könnte in der Lage sein, bei normaler Menge an IFN- γ einen Abort in Mäusen zu induzieren. Die erhöhte Expression von IFN- γ könnte somit nur einen größeren abortogenen Effekt der gleichen Menge an TNF- α bedingen. Andere Mechanismen, via derer TNF- α einen Abort auslösen kann, sind beschrieben worden (Yui *et al.*, 1994; Yui *et al.*, 1996): In vitro konnte gezeigt werden, dass TNF- α in der Lage ist „Löcher“ in einen Zellverbund von Trophoblasten zu „schneiden“ sowie die Vitalität von Trophoblastzellen zu reduzieren. Diese negativen Effekte können, so ist gezeigt worden, durch IFN- γ gesteigert werden (Yui *et al.*, 1994; Yui *et al.*, 1996). Folgender Ablauf ist wahrscheinlich: Maternale Monozyten binden an Trophoblastzellen und induzieren die Freisetzung von TNF- α , wodurch eine lokale Läsion in der Trophoblastschutzhülle entsteht, durch welche maternale Leukozyten in das fetale Gewebe einwandern können. TNF- α kann des Weiteren vaskuläres Endothel für die Bindung und zytotoxische Wirkung von PMNL sensibilisieren, indem bestimmte Adhäsionsfaktoren auf dem Endothel

heraufreguliert werden. Der TNF- α -Rezeptor p55 scheint für diese Effekte verantwortlich zu sein. In vivo sind solche Effekte an Trophoblasten nur sehr schwierig demonstrierbar, eventuell deshalb, weil EGF die Apoptose induzierende Wirkung von TNF- α und IFN- γ blockiert (Garcia-Lloret *et al.*, 1996; Garcia-Lloret *et al.*, 2000). TNF- α scheint keine nachteiligen Effekte auf Präimplantations-Embryonen zu haben. Bevor es also zur Ausbildung einer vaskularisierten Plazenta kommt, kann TNF- α keine abortogene Entwicklung entfalten (Clark *et al.*, 2001). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Stress- und IL-12-Stimulation die Inzidenz von Apoptose erhöht haben. Diese Effekte gehen wahrscheinlich auf die erhöhten Werte an TNF- α mRNA zurück, da TNF- α Apoptose induzieren kann (Yui *et al.*, 1994).

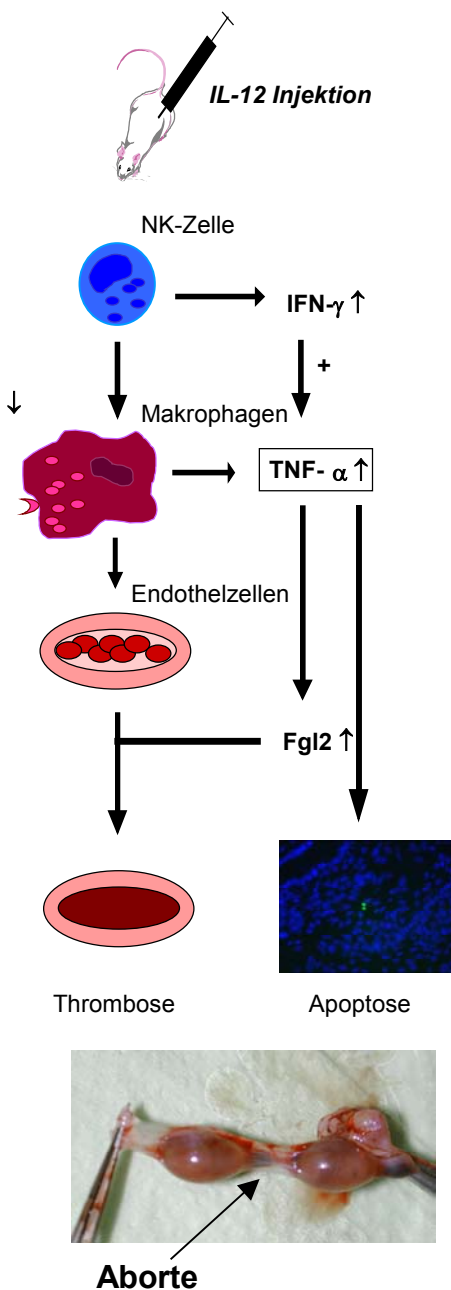
Eine weitere interessante Beobachtung dieser Arbeit ist, dass – obwohl IL-12 eine wesentlich stärkere Zytokinantwort provoziert hat als die Applikation von Stress – die Abortrate in den gestressten und den IL-12 behandelten Tieren ähnlich hoch ist. Tatsache ist, dass die Abortrate in diesen beiden Versuchen wesentlich geringer war als zuvor erreichte Abortraten durch Stressexposition (Clark *et al.*, 1998; Clark *et al.*, 1999; Arck *et al.*, 1997; Arck *et al.*, 1999; Joachim *et al.*, 2001). Eine ähnliche Situation konnte in den TNF- α und IFN- γ behandelten Tieren aus anderen Studien beobachtet werden. Es ist nicht immer möglich, eine Abortrate von > 80% zu erreichen. In manchen Mäussträngen in sehr sauberen Tiereinrichtungen ist eine Abortrate von 16-25% die maximal erzielbare Rate. Stress und Zytokinbehandlung könnten die intestinale Resorption des bakteriellen Endotoxin (LPS) in unterschiedlichem Ausmaß steigern. LPS ist ein sehr starker Stimulus für die Freisetzung von TNF- α im Uterus und LPS könnte nötig sein, damit TNF- α seine Wirkung entfalten kann, so wie es im Fall des TNF- α induced-Schock vermutet wird (Gendron *et al.*, 1980; Neilson *et al.*, 1989; Giroir *et al.*, 1992).

Das folgende hypothetische Szenario zeigt aus den Daten dieser Arbeiten abgeleitet zwei unterschiedlichen Stimuli und Wege, die zu einem Abort führen können:

Patho"physiologische" Th1-Induktion



Experimentell-inflammatorische Th1-Induktion



Die Daten dieser Arbeiten deuten an, dass Stress als psychovegetativer Stimulus das Immunsystem zur deutlich gesteigerten Produktion von TNF-α anregt, wodurch vermehrte Apoptoseaktivität im Uterus nachweisbar war und die Abortrate in den Mäusen erhöht wurde. Die psychovegetative Reaktion auf den Stressstimulus scheint insbesondere über die nervale Freisetzung von

Transmittern, insbesondere Substanz P (Joachim *et al.*, 2001) vermittelt zu sein. So konnte die Injektion eines Substanz P-Antagonisten die durch Stressexposition hervorgerufene Steigerung der Abortrate verhindern (Joachim *et al.*, 2001). Die Injektion von IL-12 hingegen scheint sowohl TNF- α und IFN- γ zu induzieren, wodurch nach den Versuchen von Clark *et al.* entsprechend hohe Mengen an fgl2 produziert werden und die Abortrate ebenfalls deutlich steigt. Daher müsste ein entzündlich bedingter Abort mit hohen Werten an IL-12 über gerinnungshemmende Medikamente analog den Versuchen von Clark *et al.* verhindert werden können. Die hier präsentierten Ergebnisse im Mausmodell haben die wichtige Frage nach verschiedenen abortiven Konstellationen aufgeworfen. Weitere Tierversuche mit neutralisierenden Antikörpern für fgl2 und CD200 (siehe oben) sowie Versuche zur Wirkung von gerinnungshemmenden Maßnahmen sind nötig, um der Rolle von fgl2 als inflammatorisch induzierter Prothrombinase in den verschiedenen abortiven Konstellationen näher zu kommen.

Die Ergebnisse der Untersuchungen im humanen Modell dieser Arbeit ob der Rolle von fgl 2 in der Pathogenese von Schwangerschaftskomplikationen wie Spontanabort und Präeklampsie werden im Folgenden diskutiert:

Im Gegensatz zu den Versuchen im Mausmodell, wo das Zytokinprofil an erfolgreichen Implantationsstellen untersucht wurde, also folglich eher einer systemischen Analyse des abortiven Stimulus entspricht, stellen die humanen Dezidua- bzw. Plazentaproben den Ort des abortiven und präeklampsischen Geschehens dar. Es ist also Gewebe, an dem das lokale Profil eines Abortes beziehungsweise einer Präeklampsie untersucht werden konnte.

Der humane Spontanabort ist mit der Exprimierung von fgl2 mRNA und mit der Erhöhung von fgl2 Proteinexpression in einem Zusammenhang zu sehen. Die Vermutung, dass fgl2 einen Einfluss auf die Rejektion eines Embryos ausübt, konnte durch diese Daten belegt werden. In Präeklampsie-Plazenten konnte ebenso eine erhöhte Expression von fgl2 beobachtet werden.

Patientinnen mit habituellen Aborten in der Anamnese haben ein erhöhtes Risiko einer fetalen Wachstumsretardierung bei einer erfolgreich ausgetragenen Schwangerschaft. Immuntherapie von habituellen Aborten hingegen ist nicht mit einem erhöhten Risiko von fetaler Wachstumsretardierung und/oder Präeklampsie bei diesen Frauen assoziiert (Reginald *et al.*, 1987; Underwood *et al.*, 1990; Ramhorst *et al.*, 2000). Gleichzeitig erhöht die Immuntherapie deutlich die Inzidenz von Lebendgeburten bei diesen Patientinnen. Vor einigen Jahren gab es einen Bericht über einen erfolgreichen Schwangerschaftsverlauf bei einer Vorgeschichte von wiederholtem fetalen Tod und Präeklampsie, nachdem die Mutter mit väterlichen Leukozyten immunisiert

worden war (Steck *et al.*, 1992). Tatsächlich kann eine Immuntherapie, wie bereits in der Einleitung erwähnt, größere Neugeborene sowohl bei Menschen als auch in der abortreichen Paarung von Mäusen bewirken. Die Messung des Gewichtes und der Dicke der Plazenta in diesen Schwangerschaften gibt Hinweise auf ein gesteigertes Wachstum der Plazenta und damit verbunden wahrscheinlich auch auf eine verbesserte Funktion (Chaouat *et al.*, 1990; Mowbray *et al.*, 1991). Man könnte die Vermutung aufstellen, dass dieses gesteigerte Wachstum von Fötus und Plazenta auf eine zumindest zum Teil verbesserte Perfusion der Plazenta verbunden mit einer verminderten Expression von fgl2 zurückzuführen ist. Diese Annahme gründet sich auf die Beobachtung, dass Frauen mit Antiphospholipid-Antikörpersyndrom, welches mit einer erhöhten Gerinnungsaktivität des Phosphatidylserins sowohl auf dem Endothel als auch auf den Trophoblasten verbunden ist, ein erhöhtes Risiko für eine Fehlgeburt oder für die Manifestation von Präeklampsie haben (Dekker *et al.*, 1995). Acetylsalizylsäure (ASS), welche über die Blockierung von COX-2 die Thrombozytenaggregation hemmt, konnte, eine, wenn auch nur geringe, Verbesserung in der Manifestation der Präeklampsie bewirken. Dies gilt nur, wenn die Therapie früh in der Schwangerschaft begonnen wurde (Sibai *et al.*, 1993). Diese Therapieform fand in der vorliegenden Arbeit keine Berücksichtigung, jedoch bestätigt diese Beobachtung zusätzlich die Vermutung, dass Koagulation ein wichtiger Mechanismus in der Pathogenese der Präeklampsie darstellt. Die nur geringe Verbesserung der Symptome der Präeklampsie nach der Therapie mit ASS wäre kongruent mit der Behauptung, dass hauptsächlich alternative Gerinnungswege in den Schwangerschaftspathologien eine Rolle spielen und somit die Plättchenaggregation nur von untergeordneter Bedeutung ist. Heparin, ein weiteres gerinnungshemmendes Medikament, welches die Wirkung von Antithrombin III potentiell verstärkt, kann ebenso Spontanaborte verhindern und die Symptome der Präeklampsie mildern (Sibai *et al.*, 1993; Shinyama *et al.*, 1996; Bar *et al.*, 2000.). Es ist wichtig festzuhalten, dass, wenn eine spezifische Prothrombinase einmal aktiviert ist, das dadurch gebildete Thrombin einen Rückkopplungsmechanismus in Gang setzt, durch den andere Wege aktiviert werden, die die Gerinnungsneigung verlängern und verstärken (Nakabayashi *et al.*, 1999). Es existieren weitere Daten, die eine erhöhte Koagulation in Präeklampsie beschreiben, wie zum Beispiel: Fibrinspaltung wird katalysiert durch Plasmin, welches aus Plasminogen entsteht. Plasminogen steht unter dem Einfluss von Plasminogen-Aktivatoren und/oder von Plasminogen-Aktivator-Inhibitoren – kurz PAI I und II. Somit erhöhen PAI I und II die Menge an verbleibendem Fibrin. PAI I wird von vaskulärem Endothel synthetisiert und PAI II von Trophoblastzellen. Bei fetaler Wachstumsretardierung ist PAI-I erhöht und PAI II ist gleichzeitig verringert, somit verbleibt – bei gleicher Prokoagulationsaktivität – eine erhöhte Menge an Fibrin in den Gefäßen. Außerdem induzierte das Serum von

präeklampsischen Frauen eine vermehrte Expression von Fibronektin in umbilikalen Venendothelzellen bei einer *in vitro* Untersuchung (Nakabayashi *et al.*, 1999). Der Tissue Faktor, Bestandteil eines weiteren Weges zur Induktion von Prothrombinase-Aktivität, ist ebenfalls erhöht in Präeklampsie (Clark *et al.*, 1999). Der Tissue Faktor wird allerdings nicht von Trophoblastzellen exprimiert. Somit sind in der Plazenta vorrangig Phosphatidylserin und fgl2 als Prothrombinasen verstärkt präsent (Labarrere *et al.*, 1991; Nakabayashi *et al.*, 1999; Sheppard *et al.*, 1999). Es ist möglich, dass Tissue Faktor in anderen Kompartimenten aktiviert wird als Folge der placentaren Hypoxie, die in der Manifestation einer Präeklampsie mündet, da die Entnahme von Membranvesikeln aus ischämischen Trophoblasten auch in anderen Gefäßen außerhalb der Plazenta toxische Effekte auf das Endothel ausübte (Johansen *et al.*, 1999).

Eine interessante Beobachtung dieser Arbeit ist, dass eine erhöhte Expression von fgl2 und eine erhöhte Expression von TNF- α in der Dezidua oder Plazenta festgestellt werden konnte. Beide Zytokine TNF- α und IFN- γ müssen appliziert werden, um spontane Abortraten von bis zu 80% in Mäusen zu induzieren. Bei niedrigen Dosen der applizierten Zytokine muss eine gemeinsame Applikation erfolgen, um einen Abort auszulösen (Clark *et al.*, 1998). Das fgl2 – isoliert aus der Leber – hat ein IFN- γ Responder-Genelement, aber keinen TNF- α Responderabschnitt. Im Gegensatz dazu hat Tissue Faktor ein TNF- α , aber kein IFN- γ Responderelement (Levy *et al.*, unpubliziert). TNF- α ist ebenfalls an der Sensibilisierung von Endothelzellen durch die Induktion von Adhäsionsrezeptoren, die eine Zelltötung durch PMNL erlauben, beteiligt. Gleichzeitig bewirkt diese Sensibilisierung die Bildung von Thrombin über die Prothrombinase fgl2 oder andere Prothrombinasen, wodurch das Endothel angeregt wird, IL-8 (MIP-2 in der Maus) zu produzieren, welches zusätzlich PMNL anlockt und aktiviert (Miyabayashi *et al.*, 1996; Clark *et al.*, 1998). Die beobachtete Häufung apoptotischer Signale in Spontanabort und Präeklampsie könnte in einem engen Zusammenhang mit den erhöhten Werten an TNF- α und fgl2 stehen. TNF- α reduziert IL-6, woraufhin eine verringerte Aktivierung von Thrombomodulin folgt. Thrombomodulin spielt eine entscheidende Rolle bei der Inaktivierung von Prothrombinasen (Labarrere *et al.*, 1991; Nakabayashi *et al.*, 1999).

Analog dem Konzept, dass mindestens zwei Zytokine, TNF- α und IFN- γ , an dem Prozess der Aktivierung des fgl2 abhängigen Gerinnungsweges beteiligt sind, existiert eine enge Korrelation zwischen den Mengen an IFN- γ und dem löslichen TNF- α -Rezeptor sowie der Entstehung einer Präeklampsie (Nakabayashi *et al.*, 1999; Williams *et al.*, 1999). IFN- γ kann zusätzlich zu der Regulation der fgl2-Expression die Expression des Integrins $\alpha v \beta 3$ auf dem Endothel herunterre-

gulieren, wodurch die Migration der Trophoblasten behindert würde. In Mäusen und auch beim Menschen ist die Expression von IFN- γ notwendig für die vaskuläre Umwandlung der Gefäße von Widerstandsgefäßen zu Kapazitätsgefäßen (Ashkar *et al.*, 2000). Erhöhte Mengen an TNF- α könnten daher eine große Rolle in der Pathogenese des Spontanabortes und der Präeklampsie spielen, in dem die Expression von TNF- α einen richtungsweisenden Ausschlag geben würde (IFN- γ wird auch in normaler Schwangerschaft exprimiert) (Nakabayashi *et al.*, 1999; Williams *et al.*, 1999). Diese These deckt sich mit der Feststellung, dass TNF- α in Spontanabort und Präeklampsie exprimiert ist. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass TNF- α Protein – nachgewiesen durch Immunhistochemie in Trophoblasten – bei Präeklampsie hochreguliert wird. Vorläufige Daten lassen zudem vermuten, dass TNF- α in Gewebe von Spontanaborten in verstärktem Maße präsent ist, aber die Methode der In-situ-Hybridisierung lässt keine statistisch verwendbare Quantifizierung zu. Sowohl in den Gewebeproben bei Spontanabort als auch bei Präeklampsie konnten neben der erhöhten Expression von TNF- α und fgl2 ein deutlicher Anstieg an Apoptose beobachtet werden. Die vorliegende Zytokin- und Gerinnungskonstellation begünstigt den Untergang von Plazentagewebe und verstärkt dadurch die Malfunktion bzw. die abortiven Vorgänge.

Die Bestätigung der Hypothese, dass eine fgl2-abhängige vermehrte Bildung von Fibrin die Migration der Trophoblasten behindert und dies die primäre pathophysiologische Entwicklung in der Entstehung des Spontanabortes und der Präeklampsie repräsentiert, kann derzeit aufgrund des Fehlens klinischer Studien über die Prävention der Entstehung des Spontanabortes und der Präeklampsie durch fgl2 inhibierende Substanzen nicht erfolgen. Im CBA x DBA-Mausmodell hat die Korrektur der Th₁/Th₂-Immunimbalance durch Immuntherapie die Resorptionen verhindert und sowohl das Geburtsgewicht als auch das Plazentagewicht gesteigert. Die Therapie mit monoklonalem Antikörper, der spezifisch fgl2 blockiert (Clark *et al.*, 1998), bewirkt höheres Geburtsgewicht und schwerere Plazenten. Plazentare Ischämie führt nicht zu Hypertension in Mäusen, aber in Ratten, weil dort durch eine tiefere Invasion des mütterlichen Gewebes der Blutdruck in der zweiten Hälfte der Trächtigkeit nicht abfällt. Ein Blutdruckanstieg ist in trächtigen Mäusen auch nicht nach einer Th₁-Zytokinaktivierung und folgender Endotoxin-vermittelter Apoptose von Trophoblasten zu beobachten. Dabei entwickelt sich keine fetale Wachstumsretardierung (Fass *et al.*, 1994; Fass *et al.*, 2000). Vermutet wird, dass Anti-fgl2 Antikörper-Applikation den Blutdruck in Ratten mit plazentarer Ischämie normalisieren könnte. Wenn sich diese prognostischen Ergebnisse vollständig im Maus- und Rattenmodell gewinnen ließen, so

würde dies einen starken Impetus für eine klinische Studie über humanspezifisches Anti-fgl2 in mit großem Risiko behafteten Schwangerschaften sowie in Schwangerschaften, in denen Frauen kurz nach einem Partnerwechsel empfangen haben (50% Risiko einer Präeklampsie) (Robillard *et al.*, 1994), bedeuten. Es wäre sinnvoll, die fgl2 mRNA Mengen und die Fibrinablagerungen in Deziduaprobe mit mangelhafter Implantation im zweiten Trimenon zu untersuchen.

Die vorliegenden Ergebnisse und deren teilweise Veröffentlichung in reproduktionsimmunologischen Zeitschriften sind ein wichtiger Beitrag, um die Zusammenhänge und Auslöser, die zu Schwangerschaftskomplikationen wie dem Spontanabort und der Präeklampsie führen, besser verstehen zu lernen. Insbesondere die Daten im Mausmodell deuten auf die Bedeutung der immunvaskulären Kommunikation hin und eröffnen hiermit die Möglichkeit, gezielt therapeutische Ansätze zu finden.

5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, die Mechanismen, die zu Schwangerschaftskomplikationen wie Spontanabort und Präeklampsie führen, genauer zu charakterisieren. Daten aus dem Mausmodell sowie Daten aus klinischen Studien haben die Vermutung nahegelegt, dass immunologisch getriggerte Schwangerschaftskomplikationen mit einer Aktivierung der Gerinnung verknüpft sind. So haben Clark *et al.* im Mausmodell für die zytokinabhängige Prothrombinase fgl2 eine Schlüssel-funktion bei murinen Aborten beschrieben. Nach einem Anstieg von TNF- α und IFN- γ werden maternale Endothelzellen zur Synthese und Sekretion von fgl2 angeregt. Fgl2 in seiner Funktion als Prothrombinase wandelt direkt Prothrombin in Thrombin um, wobei diese Aktivierung gleichzeitig zur Rekrutierung von polymorphonuklearen Leukozyten führt. Klinische Daten belegen, dass ein Antiphospholipid-Syndrom mit einer erhöhten Gerinnungsneigung (arterielle und venöse Thromben) mit einer erhöhten Abortneigung einhergeht. Im Mausmodell stand neben der Untersuchung der Gerinnungsaktivität vor allem der Vergleich eines physiologischen (stress-induzierten) mit einem entzündlich bedingten Abort im Vordergrund.

Die Daten dieser Arbeit belegen, dass ein starker inflammatorischer Stimulus (IL-12) einen Anstieg von TNF- α und IFN- γ bewirkt. Diese Ko-Expression von beiden Th₁-Zytokinen zieht die erhöhte Expression von fgl2 nach sich. Im stress-assoziierten Abortgeschehen bleibt der Anstieg von IFN- γ aus, nur TNF- α ist erhöht. Demzufolge findet sich kein Anstieg von fgl2, sondern ein Abfall. In der Untersuchung an Plazenten von Patientinnen mit Spontanabort und Präeklampsie zeigte sich eine Erhöhung der Expression von TNF- α und eine vermehrte Präsenz der Prothrombinase fgl2.

Diese Daten zeigen deutlich, dass mehrere Auslöser und mehrere Abortkaskaden im murinen Modell existieren und dass es fgl2-abhängige und fgl2-unabhängige Aborte gibt. Im Mausmodell hat sich gezeigt, dass Stress vornehmlich über die Steigerung von TNF- α auf das 5,5 fache gegenüber dem normalen Wert für TNF- α mRNA in nicht gestressten Mäusen einen Abort induziert. IFN- γ und IL-12, die beiden Leitzytokine der Th₁-Immunantwort, werden nach Stress nicht vermehrt exprimiert. Injiziert man IL-12 in trächtige Mäuse – im Sinne einer inflammatorischen Immunantwort – steigt die Expression sowohl von TNF- α als auch die von IFN- γ mRNA. Die Ko-Expression dieser beiden Th₁-Zytokine bewirkt dann einen Anstieg von fgl2. Dieser Anstieg von fgl2 ist bei Stress-induziertem Abort nicht zu beobachten, vielmehr wird fgl2 in Stress-

assoziiertem Abort herunterreguliert. Im humanen Modell gingen Spontanabort und Präeklampsie beide mit erhöhten Werten von fgl2 einher, insbesondere in den placentaren Gefäßen. Diese gesteigerte Expression von fgl2 schien gleichfalls mit einer stärkeren Ablagerung von Fibrin assoziiert. In der humanen Studie wurde, anders als im Tierversuch, die Plazenta untersucht, also das Gewebe, an dem sich die Pathologie manifestiert. Im Tiermodell hingegen konnte die systemische Antwort auf Stress beziehungsweise auf Inflammation an erfolgreichen Implantationen untersucht werden. Daher sind gerade im humanen Modell vor allem systemische Untersuchungen über die Rolle von fgl2 notwendig. Wünschenswert wäre eine prospektive Studie, die ermöglicht, das Zytokinprofil *vor* einem Spontanabort und *vor* der Manifestation einer Präeklampsie zu bestimmen. Diese Daten könnten Hinweise geben, welche Zytokinkonstellation der Erkrankung vorausgeht. Aufschlussreich wäre die Bestimmung des Plasmaspiegels (als systemische Antwort) von fgl2 *vor* und *nach* Erkrankung, um die Funktion von fgl2 genauer bestimmen zu können. Im klinischen Alltag wird Patientinnen mit systemischen Lupus erythematodes und dem häufig mit Lupus assoziierten Antiphospholipid-Syndrom bei Schwangerschaft eine Therapie mit niedrig dosiertem Heparin und ASS empfohlen. Im Mausmodell ließ sich die Abortrate ausgelöst durch die Zytokininjektion und der darauffolgende Anstieg von fgl2 durch eine Behandlung mit Heparin verhindern. Weitere Studien werden die Zytokinkonstellation und die Rolle von fgl2 in der Schwangerschaft untersuchen müssen, um die Interaktion und den Zusammenhang zwischen Th₁-Immunantwort und aktivierter Gerinnung in pathologischen Schwangerschaftsverläufen detaillierter beschreiben zu können.

6 Schriftenverzeichnis

Ansel JC, Brown JR, Payan DG, Brown MA: Substance P selectively activates TNF-alpha gene expression in murine mast cells. *J Immunol* 1993 May 15; 150(10):4478-85

Arck PC, Merali FS, Manuel J, Chaouat G, Clark DA: Stress-triggered abortion: inhibition of protective suppression and promotion of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) release as a mechanism triggering resorptions in mice. *Am J Reprod Immunol* 1995 Jan; 33(1):74-80

Arck PC, Merali F, Chaouat G, Clark DA: Inhibition of immunoprotective CD8+ T cells as a basis for stress-triggered substance P-mediated abortion in mice. *Cell Immunol* 1996 Aug 1; 171(2):226-30

Arck PC, Clark DA: Immunobiology of the decidua. *Curr Top Microbiol Immunol* 1997; 222:45-66

Arck PC, Ferrick DA, Steele-Norwood D, Croitoru K, Clark DA: Murine T cell determination of pregnancy outcome: I. Effects of strain, alphabeta T cell receptor, gammadelta T cell receptor, and gammadelta T cell subsets. *Am J Reprod Immunol* 1997 Jun; 37(6):492-502 Erratum in: *Am J Reprod Immunol* Dec; 38(6):438

Arck PC, Ferrick DA, Steele-Norwood D, Croitoru K, Clark DA: Regulation of abortion by gamma delta T cells. *Am J Reprod Immunol* 1997 Jan; 37(1):87-93

Arck PC, Troutt AB, Clark DA: Soluble receptors neutralizing TNF-alpha and IL-1 block stress-triggered murine abortion. *Am J Reprod Immunol* 1997 Mar; 37(3):262-6

Arck PC, Ferrick DA, Steele-Norwood D, Egan PJ, Croitoru K, Carding SR, Dietl J, Clark DA: Murine T cell determination of pregnancy outcome. *Cell Immunol* 1999 Sep 15; 196(2):71-9

Arck PC, Rose M, Hertwig K, Hagen E, Hildebrandt M, Klapp BF: Stress and immune mediators in miscarriage. *Hum Reprod* 2001 Jul; 16(7):1505-11

Arck PC, Handjiski B, Hagen E, Joachim R, Klapp BF, Paus R: Indications for a 'brain-hair follicle axis (BHA): Inhibition of keratinocyte proliferation and up-regulation of keratinocyte apoptosis in telogen hair follicles by stress and substance P. *FASEB J* 2001 Nov; 15(13):2536-8

Ashkar AA, Di Santo JP, Croy BA: Interferon γ contributes to initiation of uterine vascular modification, decidual integrity, and uterine natural killer cell maturation during normal murine pregnancy. *J Exp Med* 2000; 192(2):259-67

Athanassakis I, Aifantis I, Ranella A, Giouremou K, Vassiliadis S: Inhibition of nitric oxide production rescues LPS-induced fetal abortion in mice. *Nitric Oxide* 1999 Jun; 3(3):216-24

Baek KH, Choi BC, Lee JH, Choi HK, Lee SH, Kim JW, Hill JA, Chung HM, Ko JJ, Cha KY: Comparison of gene expression at the feto-maternal interface between normal and recurrent pregnancy loss patients. *Reprod Fertil Dec* 2002; 14(3-4):235-40

Bar J, Cohen-Sacher B, Hod M, Blickstein D, Lahav J, Merlob P: Low-molecular- weight heparin for thrombophilia in pregnant women. *Int J Gynaecol Obstet* 2000; 69:2

Bowen JA, Joan SH: The role of integrins in reproduction. *Proc Soc Exp Biol Med* 2000; 223: 331-343

Cai LQ, Cao YJ, Duan EK: Effects of leukaemia inhibitory factor on embryo implantation in the mouse. *Cytokine* 2000 Nov; 12(11):1676-82

Chaouat G, Menu E, Clark DA, De M, Minkowski M, Wegmann TG: Control of fetal survival in CBA x DBA/2 mice by lymphokine therapy. *J Reprod Fert* 1990; 89:447-458

Chaouat G, Assal Meliani A, Martal J, Raghupathy R, Elliot J, Mosmann T, Wegmann TG: IL-10 prevents naturally occurring fetal loss in the CBA x DBA/2 mating combination, and local defect in IL-10 production in this abortion-prone combination is corrected by in vivo injection of IFN-tau. *J Immunol* 1995 May 1; 154(9):4261-8

Chaouat G, Zourbas S, Ostojic S, Lappree-Delage G, Dubanchet S, Ledee N, Martal J: A brief review of recent data on some cytokine expressions at the materno-foetal interface which might challenge the classical Th1/Th2 dichotomy. *J Reprod Immunol* 2002 Jan; 53(1-2):241-56

Chrousos GP: Stressors, stress, and neuroendocrine integration of the adaptive response. The 1997 Hans Selye Memorial Lecture. *Ann N Y Acad Sci* 1998 Jun 30; 851:311-35

Chumbley G, King A, Robertson K, Holmes N, Loke YW: Resistance of HLA-G and HLA-A2 transfectants to lysis by decidual NK cells. *Cell Immunol* 1994 May; 155(2):312-22

Clark DA, McDermott MR: Impairment of host vs graft reaction in pregnant mice. I. Suppression of cytotoxic T cell generation in lymph nodes draining the uterus. *J Immunol* 1978 Oct; 121(4):1389-93

Clark DA, Croy BA, Rossant J, Chaouat G: Immune presensitization and local intrauterine defences as determinants of success or failure of murine interspecies pregnancies. *J Reprod Fertil* 1986 Jul; 77(2):633-43

Clark DA, Slapsys R, Chaput A, Walker C, Brierley J, Daya S, Rosenthal KL: Immunoregulatory molecules of trophoblast and decidual suppressor cell origin at the maternofetal interface. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 1986 Mar; 10(3):100-4

Clark DA: Does immunological intercourse prevent pre-eclampsia? *Lancet* 1994; 344:969-970

Clark DA, Arck PC, Jalali R, Merali FS, Manuel J, Chaouat G, Underwood JL, Mowbray JF: Psycho-neuro-cytokine/endocrine pathways in immunoregulation during pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 1996 Apr; 35(4):330-7

Clark DA, Merali FS, Hoskin DW, Steel-Norwood D, Arck PC, Croitoru K, Murgita RA, Hirte H: Decidua-associated suppressor cells in abortion-prone DBA/2-mated CBA/J mice that release bioactive transforming growth factor beta2-related immunosuppressive molecules express a bone marrow-derived natural suppressor cell marker and gamma delta T-cell receptor. *Biol Reprod* 1997 May; 56(5):1351-60

Clark DA, Arck PC, Chaouat G: Why did your mother reject you? Immunogenetic determinants of the response to environmental selective pressure expressed at the uterine level. *Am J Reprod Immunol* 1999 Jan; 41(1):5-22

Clark DA, Chaouat G, Arck PC, Mittruecker HW, Levy GA: Cytokine-dependent abortion in CBA x DBA/2 mice is mediated by the procoagulant fgl2 prothrombinase [correction of prothombinase]. *J Immunol* 1998 Jan 15;160(2):545-9 Erratum in: *J Immunol* 1999 Mar 1; 162(5):3105

Clark DA, Chaouat G, Ding JW, August C, Coulam CB, Levy GA: Fgl2 in pregnancy: a novel prothrombinase at the fetomaternal interface may prevent bleeding and cause abortions. *Am J Reprod Immunol* 1999; 41:374

Clark DA, Ding JW, Yu G, Levy GA, Gorczynski RM: Fgl2 prothrombinase expression in mouse trophoblast and decidua triggers abortion but may be countered by OX-2. *Mol Hum Reprod* 2001 Feb; 7(2):185-94

Clark DA, Yu G, Levy GA, Gorczynski RM: Procoagulants in fetus rejection: the role of the OX-2 (CD200) tolerance signal. *Semin Immunol* 2001 Aug; 13(4):255-63

Croy BA, Di Santo JP, Greenwood JD, Chantakru S, Ashkar AA: Transplantation into genetically alymphoid mice as an approach to dissect the roles of uterine natural killer cells during pregnancy – a review. *Placenta* 2000 Mar-Apr; 21 Suppl A:S77-80

Damsky CH, Librach C, Lim KH, Fitzgerald ML, McMaster MT, Janatpour M, Zhou Y, Logan SK, Fisher SJ: Integrin switching regulates normal trophoblast invasion. *Development* 1994; 120:3657-3666

Daniel Y, Kupferminc MJ, Baram A, Jaffa AJ, Fait G, Wolman I, Lessing JB: Plasma interleukin-12 is elevated in patients with preeclampsia. *Am J Reprod Immunol* 1998 Jun; 39(6):376-80

Dekker GA, de Vries JI, Doelitzsch PM, Huijgens PC, von Blomberg BM, Jakobs C, van Geijn HP: Underlying disorders associated with severe early onset of preeclampsia. *Am J Obstet and Gynecol* 1995; 173:1042-1048

Dekker GA et Sibai BM: Etiology and pathogenesis of preeclampsia: current concepts. *Am J Obstet and Gynecol* 1998; 179: 1359-1375

DiFederico E, Genbacev O, Fisher SJ: Preeclampsia is associated with widespread apoptosis of placental cytotrophoblasts within the uterine wall. *Am J Pathol* 1999; *155*:293-301

Ding JW, Ning Q, Liu MF, Lai A, Leibowitz J, Peltekian KM, Cole EH, Fung LS, Holloway C, Marsden PA, Yeger H, Phillips MJ, Levy GA: Fulminant hepatic failure in murine hepatitis virus strain 3 infection: tissue-specific expression of a novel fgl2 prothrombinase. *J Virol* 1997 Dec; *71*(12):9223-30; Erratum in: *J Virol* 1998 Apr; *72*(4):3504 (a)

Ding JW, Ning Q, Liu MF, Lai A, Peltekian K, Fung L, Holloway C, Yeger H, Phillips MJ, Levy GA: Expression of the fgl2 and its protein product (prothrombinase) in tissues during murine hepatitis virus strain-3 (MHV-3) infection. *Adv Exp Med Biol* 1998; *440*:609-18 (b)

Fantuzzi G, Reed DA, Dinarello CA: IL-12-induced IFN- γ is dependent on caspase-1 processing of the IL-18 precursor. *J Clin Invest* 1999 Sep; *104*(6):761-7

Fass MM, Schulling GA, Baller JFW, Vischer CA, Bakker WW: A new animal model for human preeclampsia: ultra-low-dose endotoxin infusion in pregnant rats. *Am J Obstet Gynecol* 1994; *171*:158-164

Fass MM, Schulling GA, Linton EA, Sargent IL, Redman CWG: Activation of peripheral leukocytes in rat pregnancy and experimental preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2000; *182*:351-357

Friedman SA, de Groot CJ, Taylor RN, Golditch BD, Roberts JM: Plasma cellular fibronectin as a measure of endothelial involvement in preeclampsia and intrauterine growth retardation. *Am J Obstet Gynecol* 1994; *170*: 838-841

Gadient RA, Patterson PH: Leukemia inhibitory factor, Interleukin 6, and other cytokines using the GP130 transducing receptor: roles in inflammation and injury. *Stem Cells* 1999; *17*(3):127-37

Garcia-Lloret M, Yui J, Winkler-Lowen B, Guilbert LJ: Epidermal growth factor inhibits cytokine-induced apoptosis of primary human trophoblasts. *J Cell Physiol* 1996; *167*(2):324-32

Garcia-Lloret M, Winkler-Lowen B, Guilbert LJ: Monocytes adhering by LFA-1 to placental syncytiotrophoblasts induce local apoptosis via release of TNF- α . A model for hematogenous initiation of placental inflammation. *J Leuk Biol* 2000; 68(6):903-8

Gendron RL, Nestel FP, Lapp WS, Baines MG: Lipolysaccharide-induced fetal resorption in mice is associated with the intrauterine production of tumor necrosis factor α . *J Reprod Fertil* 1990; 90(2):395-02

Giroir BP, Johnson JH, Brown T, Allen GL, Beutler GL: The distribution of tumor necrosis factor α biosynthesis during endotoxemia. *J Clin Invest* 1992; 90(3):693-8

Goldmann D: Der Einfluss von wahrgenommenen Stress auf krankheitsspezifische immunologische Parameter bei Patienten mit Morbus Crohn; Dissertation eingereicht an der Medizinischen Fakultät der Charité 2002

Guimond MJ, Luross JA, Wang B, Terhorst C, Danial S, Croy BA: Absence of natural killer cells during murine pregnancy is associated with reproductive compromise in TgE26 mice. *Biol Reprod* 1997 Jan; 56(1):169-79

Haddad EK, Duclos AJ, Anteck E, Lapp WS, Baines MG: Role of interferon-gamma in the priming of decidual macrophages for nitric oxide production and early pregnancy loss. *Cell Immunol* 1997 Oct 10; 181(1):68-75

Haimovici F, Hill JA, Anderson DJ: The effect of soluble products of activated lymphocytes and macrophages on blastocyst implantation events in vitro. *Biol Reprod* 1991; 44:69-75

Halperin R, Peller S, Rotschild M, Bukovsky I, Schneider D: Placental apoptosis in normal and abnormal pregnancies. *Gynecol Obstet Invest* 2000; 50(2):84-7

Hambartsoumian E, Srivastava RK, Seibel MM: Differential expression and regulation of inducible nitric oxide synthase (iNOS) mRNA in human trophoblasts in vitro. *Am J Reprod Immunol* 2001 Feb; 45(2):78-85

Hayakawa S, Fujikawa T, Fukuoka H, Chisima F, Karasaki-Suzuki M, Ohkoshi E, Ohi H, Kiyoshi Fujii T, Tochigi M, Satoh K, Shimizu T, Nishinarita S, Nemoto N, Sakurai I: Murine fetal

resorption and experimental pre-eclampsia are induced by both excessive Th1 and Th2 activation. *J Reprod Immunol* 2000 Jul; 47(2):121-38; Erratum in: *J Reprod Immunol* 2001 Jan;49(1):95

Hildebrandt M, Arck PC, Kruber S, Demuth HU, Reutter W, Klapp BF: Inhibition of dipeptidyl peptidase IV (DP IV, CD26) activity abrogates stress-induced, cytokine-mediated murine abortions. *Scand J Immunol* 2001 May; 53(5):449-54

Hill JA: T-helper 1-type immunity to trophoblast: evidence for a new immunological mechanism for recurrent abortion in women. *Hum Reprod* 1995 Dec; 10 Suppl 2:114-20

Ida A, Tsuji Y, Muranaka J, Kanazawa R, Nakata Y, Adachi S, Okamura H, Koyama K: IL-18 in pregnancy; the elevation of IL-18 in maternal peripheral blood during labour and complicated pregnancies. *J Reprod Immunol* 2000 May; 47(1):65-74

Joachim RA, Hildebrandt M, Oder J, Klapp BF, Arck PC: Murine stress-triggered abortion is mediated by increase of CD8⁺ TNF- α ⁺ decidual cells via substance P. *Am J Reprod Immunol* 2001 May; 45(5):303-9

Joachim RA, Zenclussen AC, Polgar, Douglas AJ, Fest S, Knackstedt MK, Klapp BF, Arck PC: The progesterone derived dydrogesterone abrogates murine stress-triggered abortion by inducing a Th2 biased local immune response. *Steroids*. 2003 Nov; 68(10-13):931-40.

Johansen M, Redman CW, Wilkins T, Sargent IL: Trophoblast deportation in human pregnancy – its relevance for preeclampsia. *Placenta* 1999; 20:531-539

Jones CA, Finlay-Jones JJ, Hart PH: Type 1 and type 2 cytokines in human late gestation decidual tissue. *Biol Reprod* 1997; 57:303-311

Kamijo R, Harada H, Matsuyama T, Bosland M, Gerecitano J, Shapiro D, Le J, Koh SI, Kimura T, Green SJ, et al.: Requirement for transcription factor IRF-1 in NO synthase induction in macrophages. *Science* 1994 Mar 18; 263(5153):1612-5

Khong TY, De Wolf F, Robertson WB, Brosens I: Inadequate maternal vascular response to placentation in pregnancies complicated by pre-eclampsia and by small for gestational age infants. *Br J Obstet Gynecol* 1986; 93:1049-1059

Khong TY, Liddell HS, Robertson WB: Defective haemochorial placentation as a cause of miscarriage. A preliminary study. *Br J Obstet Gynecol* 1987; 94:649-655

King NJ, Drake BL, Maxwell LE, Rodger JC: Class I major histocompatibility complex antigen expression on early murine trophoblast and its induction by lymphokines in vitro. II. The role of gamma interferon in the responses of primary and secondary giant cells. *J Reprod Immunol* 1987 Sep; 12(1):13-21

Kjaergaard J, Peng L, Cohen PA, Drazba JA, Weinberg AD, Shu S Augmentation versus inhibition: effects of conjunctival OX-40 receptor monoclonal antibody and IL-2 treatment on adoptive immunotherapy of advanced tumor. *J Immunol.* 2001; 167: 6669-6677

Knackstedt M, Ding JW, Arck PC, Hertwig K, Coulam CB, August C, Lea R, Dudenhausen JW, Gorczynski RM, Levy GA, Clark DA: Activation of the novel prothrombinase, fgl2, as a basis for the pregnancy complications spontaneous abortion and pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol* 2001 Sep; 46(3):196-210

Knackstedt MK, Zenclussen AC, Hertwig K, Hagen E, Dudenhausen JW, Clark DA & Arck PC: Th1 cytokines and the prothrombinase fgl2 in stress-triggered and inflammatory abortion. *Am J Reprod Immunol.* 2003 Apr; 49(4):210-20

Kokawa K, Shikone T, Nakano R: Apoptosis in human chorionic villi and decidua in normal and ectopic pregnancy. *Mol Hum Reprod* 1998 Jan; 4(1):87-91

Kovats S, Main EK, Librach C, Stubblebine M, Fisher SJ, DeMars R: A class I antigen, HLA-G, expressed in human trophoblasts. *Science* 1990 Apr 13; 248(4952):220-3

Krishnan L, Guilbert LJ, Wegmann TG, Belosevic M, Mosmann TR: T helper 1 response against *Leishmania major* in pregnant C57BL/6 mice increases implantation failure and fetal resorptions. Correlation with increased IFN-gamma and TNF and reduced IL-10 production by placental cells. *J Immunol* 1996; 156(2):653-62 (a)

Krishnan L, Guilbert LJ, Wegmann TG, Belosevic M, Mosmann TR: T helper 1 response against *Leishmania major* in pregnant C57BL/6 mice increases implantation failure and fetal resorptions. Correlation with increased IFN-gamma and TNF and reduced IL-10 production by placental cells. *J Immunol* 1996; 156(2):653-62 (b)

Kunjara S, Greenbaum AL, Wang DY, Caro HN, McLean P, Redman CW, Rademacher TW: Inositol phosphoglycans and signal transduction systems in pregnancy in preeclampsia and diabetes: evidence for a significant regulatory role in preeclampsia at placental and systemic levels. *Mol Genet Metab* 2000 Feb; 69(2):144-58

Labarrere CA, Faulk WP: Anchoring villi in human placental basal plate: lymphocytes, macrophages, and coagulation. *Placenta* 1991; 12:173-182.

Le Gal FA, Riteau B, Sedlik C, Khalil-Daher I, Menier C, Dausset J, Guillet JG, Carosella ED, Rouas-Freiss N: HLA-G-mediated inhibition of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *Int Immunol* 1999 Aug; 11(8):1351-6

Leach RE, Romero R, Kim YM, Chaiworapongsa T, Kilburn B, Das SK, Dey SK, Johnson A, Qureshi F, Jacques S, Armant DR: Pre-eclampsia and expression of heparin-binding EGF-like growth factor. *Lancet* 2002 Oct 19; 360(9341):1215-9

Ledee-Bataille N, Lapree-Delage G, Taupin JL, Dubanchet S, Frydman R, Chaouat G: Concentration of leukaemia inhibitory factor (LIF) in uterine flushing fluid is highly predictive of embryo implantation. *Hum Reprod* 2002 Jan; 17(1):213-8

Levy GA, Liu M, Ding J, Yuwaraj S, Leibowitz J, Marsden PA, Ning Q, Kovalinka A, Phillips MJ: Molecular and functional analysis of the human prothrombinase gene (HFGL2) and its role in viral hepatitis. *Am J Pathol* 2000 Apr; 156(4):1217-25

Levy R, Smith SD, Chandler K, Sadovsky Y, Nelson DM: Apoptosis in human cultured trophoblasts is enhanced by hypoxia and diminished by epidermal growth factor. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000 May; 278(5):C982-8

Lin H, Mosmann TR, Guilbert L, Tuntipopipat S, Wegmann TG: Synthesis of T helper 2-type cytokines at the maternal-fetal interface. *J Immunol* 1993; 151(9):4562-73

Liu MF, Levy GA: A gas-like DNA cis element regulates the expression of fgl2 prothrombinase/fibroblast growth factor in macrophage cells in response to interferon γ . *Hepatology* 2001 Oct; 34(4):266A

Ljunggren HG, Karre K: In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today* 1990 Jul; 11(7):237-44

Loke YW, King A: Immunology of human placental implantation: clinical implications of our current understanding. *Mol Med Today* 1997 Apr; 3(4):153-9

Loke YW, King A: Reply to Rinkevitch: Immunology of human implantation: from the invertebrate's point of view. *Hum Reprod* 1998 Feb; 13(2):503

Maejima M, Fujii T, Kozuma S, Okai T, Shibata Y, Taketani Y: Presence of HLA-G-expressing cells modulates the ability of peripheral blood mononuclear cells to release cytokines. *Am J Reprod Immunol* 1997 Aug; 38(2):79-82

Markert UR, Arck PC, McBey BA, Manuel J, Croy BA, Marshall JS, Chaouat G, Clark DA: Stress triggered abortions are associated with alterations of granulated cells into the decidua. *Am J Reprod Immunol* 1997 Jan; 37(1):94-100

Marx L, Arck P, Kieslich C, Mitterlechner S, Kapp M, Dietl J: Decidual mast cells might be involved in the onset of human first-trimester abortion. *Am J Reprod Immunol* 1999 Jan; 41(1):34-40.

Marzi M, Vigano A, Trabattoni D, Villa ML, Salvaggio A, Clerici E, Clerici M: Characterization of type 1 and type 2 cytokine profile in physiologic and pathologic human pregnancy. Clin Exp Immunol 1996; 106:127-133

Matsuyama T, Kimura T, Kitagawa M, Pfeffer K, Kawakami T, Watanabe N, Kundig TM, Amakawa R, Kishihara K, Wakeham A, et al.: Targeted disruption of IRF-1 or IRF-2 results in abnormal type I IFN gene induction and aberrant lymphocyte development. Cell 1993 Oct 8; 75(1):83-97

Medawar PB: Some immunological and endocrinological problems raised by the evolution of viviparity in vertebrates. Symp Soc Exp Biol 1953; 44:320-338

Miyabayashi M, Yasui K: Regulation of neutrophil O₂⁻ production by neutrophil-endothelial cell interaction via CD11b: its modulation by tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and lipopolysaccharide (LPS). Int J Hematol 1996 Dec; 65(1):49-59

Mowbray JF, Underwood J: Effect of paternal lymphocyte immunisation on birthweight and pregnancy outcome. In Cellular and Molecular Biology of the Materno-Fetal Relationship. INSERM Colloque Vol. 212. Chaouat G, Mowbray JF (eds). Paris, John Libby Eurotext. 1991, pp 295-302

Munno I, Chiechi LM, Lacedra G, Berardesca C, Patimo C, Marcuccio L, Nardelli P, Loizzi P: Evaluation of nonspecific immunity and plasma levels of interferon-gamma, interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha in preeclampsia. Immunopharmacol Immunotoxicol 1999 Aug; 21(3):551-64

Nakabayashi M, Asami M, Nakatani A: Efficacy of antithrombin replacement therapy in severe early-onset preeclampsia. Semin Thromb Haemos 1999; 25:463-466

Neilson IR, Neilson KA, Yunis EJ, Rowe ML: Failure of tumor necrosis factor to produce hypotensive shock in the absence of endotoxin. Surgery 1989; 106:439-43

Niess JH, Monnikes H, Dignass AU, Klapp BF, Arck PC: Review on the influence of stress on immune mediators, neuropeptides and hormones with relevance for inflammatory bowel disease. *Digestion* 2002; 65(3):131-40

Noun A, Acker GM, Chaouat G, Antoine JC, Garabedian M: Cells bearing granulocyte-macrophage and T lymphocyte antigens in the rat uterus before and during ovum implantation. *Clin Exp Immunol* 1989 Dec; 78(3):494-8

Palfi M, Jablonowska B, Matthiesen L, Ernerudh J: Circulating interferon-gamma- and interleukin-4-secreting cells in recurrent spontaneous abortions. *Am J Reprod Immunol* 1999 Apr; 41(4):257-63

Piccinni MP, Beloni L, Livi C, Maggi E, Scarselli G, Romagnani S: Defective production of both leukemia inhibitory factor and type 2 T-helper cytokines by decidual T cells in unexplained recurrent abortions. *Nat Med* 1996 Sep; 4(9):1020-4

Pijnenborg R, Anthony J, Davey DA, Rees A, Tiltman A, Vercruysse L, van Assche A: Placental bed spiral arteries in the hypertensive disorder of pregnancy. *Br J Obstet Gynecol* 1991; 98:648-655

Pijnenborg R, Luyten C, Vercruysse L, Van Assche FA: Attachment and differentiation in vitro of trophoblast from normal and preeclamptic human placentae. *Am J Reprod Immunol* 1996; 175:30-36 (a)

Pijnenborg R: The placental bed. *Hypertens Pregnancy*; 15:7-23 (b)

Qureshi ST, Clermont S, Leibowitz J, Fung LS, Levy G, Malo D: Mouse hepatitis virus-3 induced prothrombinase (Fgl2) maps to proximal chromosome 5. *Genomics* 1995 Sep 1; 29(1):307-9

Raghupathy R, Makhseed M, Azizieh F, Hassan N, Al-Azemi M, Al-Shamali E: Maternal Th1- and Th2-type reactivity to placental antigens in normal human pregnancy and unexplained recurrent spontaneous abortions. *Cell Immunol* 1999 Sep 15; 196(2):122-30

Raghupathy R: Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. *Immunol Today* 1997 Oct; 18(10):478-82

Ramhorst R, Agriello E, Zittermann S, Pando M, Larriba J, Irigoyen M, Cortelezzi M, Auge L, Lombardi E, Etchepareb JJ, Contreras Ortiz C, Fainboim L: Is the paternal mononuclear cells' immunization a successful treatment for recurrent spontaneous abortion? *Am J Reprod Immunol*. 2000; 44:129-135

Reginald PW, Beard RW, Chapple J, Forbes PB, Liddell HS, Mowbray JF, Underwood JL: Outcome of pregnancies progressing beyond 28 weeks gestation in women with a history of recurrent miscarriage. *Brit J Obstet Gynecol* 1987; 94:643-648

Reid JG, Simpson NA, Walker RG, Economidou O, Shillito J, Gooi HC, Duffy SR, Walker JJ: The carriage of pro-inflammatory cytokine gene polymorphisms in recurrent pregnancy loss. *Am J Reprod Immunol* 2001 Jan; 45(1):35-40

Reister F, Frank HG, Kingdom JC, Heyl W, Kaufmann P, Rath W, Huppertz B: Macrophage-induced apoptosis limits endovascular trophoblast invasion in the uterine wall of preeclamptic women. *Lab Invest* 2001 Aug; 81(8):1143-52

Rezaei A, Dabbagh A: T-helper (1) cytokines increase during early pregnancy in women with a history of recurrent spontaneous abortion. *Med Sci Monit* 2002 Aug; 8(8):CR607-10

Robillard PY, Hulsey TC, Perianin J, Janky E, Miri EH, Papiernik E: Association of pregnancy-induced hypertension with duration of sexual cohabitation before conception. *Lancet* 1994 Oct 8; 344(8928):973-5

Roitt I, Brostoff J, Male D: *Immunology* (5th Edition). Mosby International Ltd; 1998

Sabahi F, Rola-Pleszczynski M, O'Connell S, Frenkel LD: Qualitative and quantitative analysis of T lymphocytes during normal human pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 1995; 33:381-392

Saito S, Umekage H, Sakamoto Y, Sakai M, Tanebe K, Sasaki Y, Morikawa H: Increased t-helper-1-type immunity and decreased t-helper-2-type immunity in patients with preeclampsia. *Am J Reprod Immunol* 1999; 41:297-306

Sakai M, Tsuda H, Tanebe K, Sasaki Y, Saito S: Interleukin-12 secretion by peripheral blood mononuclear cells is decreased in normal pregnant subjects and increased in preeclamptic patients. *Am J Reprod Immunol* 2002 Feb; 47(2):91-7

Savion S, Lepsky E, Orenstein H, Carp H, Shepshelovich J, Torchinsky A, Fein A, Toder V: Apoptosis in the uterus of mice with pregnancy loss. *Am J Reprod Immunol* 2002 Feb; 47(2):118-27

Seder RA, Gazzinelli R, Sher A, Paul WE: Interleukin 12 acts directly on CD4⁺ T cells to enhance priming for interferon γ production and diminishes interleukin 4 inhibition of such priming. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993 Nov 1; 90(21):10188-92

Sheppard BL, Bonnar J: Scanning electron microscopy of the human placenta and decidual spiral arteries in normal pregnancy. *J Obstet Gynaecol Br Commonw* Jan;81(1):20-9 (a)

Sheppard BL, Bonnar J: The ultrastructure of the arterial supply of the human placenta in early and late pregnancy. *J Obstet Gynaecol Br Commonw* 1974 Jul;81(7):497-511 (b)

Sheppard BL, Bonnar J: The ultrastructure of the arterial blood supply of human pregnancies complicated by fetal growth retardation. *Br J Obstet Gynecol* 1976; 83:948-959

Shinyama H, Akira T, Uchida T, Hirahara K, Watanabe M, Kagitani Y: Antithrombin III prevents renal dysfunction and hypertension induced by enhanced intravascular coagulation in pregnant rats: pharmacological confirmation of the benefits of treatment with antithrombin III in preeclampsia. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1996 May; 27(5):702-11

Sibai BM, Caritis SN, Thom E, Klebanoff M, McNellis D, Rocco L, Paul RH, Romero R, Witter F, Rosen M et al: Prevention of preeclampsia with low dose aspirin in healthy, nulliparous pregnant women. The National Institute of Child Health and Human Development Maternal-Fetal Medicine Units. *New Engl J Med* 1993; 329:1213-1218

Stead RH, Franks AJ, Goldsmith CH, Bienenstock J, Dixon MF: Mast cells, nerves and fibrosis in the appendix: a morphological assessment. *J Pathol* 1990 Jul; 161(3):209-19

Steck T, Westphal E, Wurfel W: Maternal immunization by husband's leukocytes for repeated fetal death associated with mild pre-eclampsia—case report with successful outcome. *Arch Gynecol Obstet* 1992; 252:103-107

Stewart CL, Kaspar P, Brunet LJ, Bhatt H, Gadi I, Kontgen F, Abbondanzo SJ: Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature* 1992 Sep 3;359(6390):76-9

Tokmadzic VS, Tsuji Y, Bogovic T, Laskarin G, Cupurdija K, Strbo N, Koyama K, Okamura H, Podack ER, Rukavina D: IL-18 is present at the maternal-fetal interface and enhances cytotoxic activity of decidual lymphocytes. *Am J Reprod Immunol* 2002 Oct; 48(4):191-200

Trinchieri G, Peritt D, Gerosa F: Acute induction and priming for cytokine production in lymphocytes. *Cytokine Growth Factor Rev* 1996 Aug; 7(2):123-32

Underwood, J: The effect of immunisation with paternal lymphocytes in women with recurrent spontaneous abortion. PhD Thesis, Univ. London (UK); 1990

Verma S, King A, Loke YW: Expression of killer cell inhibitory receptors on human uterine natural killer cells. *Eur J Immunol* 1997 Apr; 27(4):979-83

Vives A, Balasch J, Yague J, Quinto L, Ordi J, Vanrell JA: Type-1 and type-2 cytokines in human decidual tissue and trophoblasts from normal and abnormal pregnancies detected by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). *Am J Reprod Immunol* 1999 Dec; 42(6):361-8

Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR: Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a Th2 phenomenon? *Immunol Today* 1993; 14:353-358

Wilczynski JR, Tchorzewski H, Glowacka E, Banasik M, Lewkowicz P, Szpakowski M, Zeman K, Wilczynski J: Cytokine secretion by decidual lymphocytes in transient hypertension of pregnancy and pre-eclampsia. *Mediators Inflamm* 2002 Apr; 11(2):105-11

Williams MA, Farrand A, Mittendorf R, Sorensen TK, Zinghein RW, O'Reilly GCO, King IB, Zebelman AM, Luthy DA: Maternal second trimester serum tumor necrosis factor- α -soluble receptor p55 (sTNFp55) and subsequent risk of preeclampsia. *Am J Epidemiol* 1999; 149:323-329

Wolf SF, Temple PA, Kobayashi M, Young D, Dicig M, Lowe L, Dzialo R, Fitz L, Ferenz C, Hewick RM, et al: Cloning of cDNA for natural killer cell stimulatory factor, a heterodimeric cytokine with multiple biologic effects on T and natural killer cells. *J Immunol* 1991 May 1; 146(9):3074-81

Yeaman GR, Collins JE, Currie JK, Guyre PM, Wira CR, Fanger MW: IFN-gamma is produced by polymorphonuclear neutrophils in human uterine endometrium and by cultured peripheral blood polymorphonuclear neutrophils. *J Immunol* 1998 May 15; 160(10):5145-53

Yui J, Garcia-Lloret M, Wegmann TG, Guilbert LJ: Cytotoxicity of tumor necrosis factor- α and γ -interferon against primary human placental trophoblasts. *Placenta* 1994 Dec; 15(8):819-35

Yui J, Hemmings D, Garcia-Lloret M, Guilbert LJ: Expression of the human p55 and p75 tumor necrosis factor receptors in primary villous trophoblasts and their role in cytotoxic signal transduction. *Biol Reprod* 1996 Aug; 55(2):400-9

Yusuf K, Smith SD, Levy R, Schaiff WT, Wyatt SM, Sadovsky Y, Nelson DM: Thromboxane A(2) limits differentiation and enhances apoptosis of cultured human trophoblasts. *Pediatr Res* 2001 Aug; 50(2):203-9

Zenclussen AC, Joachim R, Hagen E, Peiser C, Klapp BF, Arck PC: Heme oxygenase is down-regulated in stress-triggered and interleukin-12-mediated murine abortion. *Scand J Immunol* 2002 Jun; 55(6):560-9

Zenclussen AC, Lim E, Knoeller S, Knackstedt M, Hertwig K, Hagen E, Klapp BF, Arck PC: Heme oxygenases in pregnancy II: HO-2 is downregulated in human pathologic pregnancies. *Am J Reprod Immunol*. 2003 Jul; 50(1):66-76

Zhou Y, Damsky CH, Fisher SJ: Preeclampsia is associated with failure of human cytotrophoblasts to mimic a vascular adhesion phenotype. *J Clin Invest* 1997; 99: 2152-2164 (a)

Zhou Y, Fisher SJ, Janatpour M, Genbacev O, Dejana E, Wheelock M, Damsky CH: Human cytotrophoblasts adopt a vascular phenotype as they differentiate: A strategy of successful endovascular invasion? *J Clin Invest*; 99: 2139-2151 (b)

Anhang

Publikationsliste

M. Knackstedt, A.C. Zenclussen, K. Hertwig, E. Hagen, J.W. Dudenhausen, D.A. Clark and P.C. Arck: **Th1 cytokines and the prothrombinase fgl2 in stress-triggered and inflammatory abortion.**

Am J Reprod Immunol. 2003 Apr; 49(4):210-20

M. Knackstedt, J.W. Ding, P.C. Arck, K. Hertwig, C.B. Coulam, C. August, R. Lea, J. W. Dudenhausen, R.M. Gorczynski, G.A. Levy und D.A. Clark: **Activation of the novel prothrombinase, fgl2, as a basis for pregnancy compliations, spontaneous abortion and preeclampsia**

Am J Reprod Immunol. 2001; 46:196-210

R. Joachim, A.C. Zenclussen, B. Polgar, A.J. Douglas, S. Fest, M. Knackstedt, B.F. Klapp, P.C. Arck: **The progesterone derived dydrogesterone abrogates murine stress-triggered abortion by inducing a Th2 biased local immune response.**

Steroids. 2003 Nov; 68(10-13):931-40

A.C. Zenclussen, E. Lim, S. Knöller, M. Knackstedt, P.C. Arck: **Role of heme-oxygenase (HO) in reproduction II: HO-1 is downregulated in pathological human pregnancies.**

Am J Reprod Immunol. 2003 Jul; 50(1):66-76

Danksagung

Frau PD Dr. Petra Arck gilt mein allergrößter Dank für ihre unablässige Unterstützung und die kompetente Betreuung während der letzten vier Jahre. Sie hat meinen Ideen und “Sonderwünschen” (Auslandsaufenthalte, etc.) Richtung und Zielsetzung gegeben. Sie war mir Lehrerin und Vorbild zugleich!

Herrn Prof. Dr. J.-W. Dudenhausen möchte ich herzlich für die gezielte Unterstützung bei der wissenschaftlichen Ausarbeitung dieser Arbeit danken. Auch das Doktorandenstipendium („studentische Forschungsförderung“) und den Auslandsaufenthalt in Toronto, Kanada habe ich ihm zu verdanken.

I would like to thank Prof. Dr. David Clark for bringing fgl2 in my life and for transforming this thesis in an international cooperation. It was a great honor to me to have the chance to work with such an experienced reproductive immunologist.

Dr. Kai Hertwig möchte die wissenschaftliche Betreuung, auch von der klinischen Seite her, danken. Auch war er es, der das Thema der vorliegenden Arbeit angeregt hat.

Evelin Hagen gilt mein Dank im Hinblick auf die tatkräftige Unterstützung im Labor. Wenn es technisch Probleme gab, war sie stets bereit zu helfen. Sie hat mir Freude und Begeisterung an der Arbeit im Labor vermittelt.

Der gesamten Arbeitsgruppe Arck, namentlich Ruth Plieth, Petra Busse, Dr. Ricarda Joachim, Dr. Ana Zenclussen, Denis Goldmann, Judith Götze möchte ich für die vielen Hilfestellungen und für die schöne Zeit in der „Laborfamilie Arck“ danken.

Herzlich möchte ich mich bei Andreas Nitsche für die molekularbiologische Supervision und für das Design der Taq-Man-Sonden bedanken.

Großen Dank verdient die Korrekturleserin Anja Günther! Sie hat viele hilfreiche Umformulierungsvorschläge gemacht.

Besonders möchte ich auch meiner Familie, meinem Vater, meiner Mutter und meinem Bruder für den Beistand, den bedingungslosen Rückhalt und die finanzielle Unterstützung danken.

Ganz besonderen Dank hat David Pincus verdient, der mir insbesondere in den letzten Tagen vor dem Abgabetermin der Arbeit zur Seite gestanden und aufopferungsbereit geholfen hat.

Erklärung an Eides statt

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und verfasst habe. Ich habe keine unerlaubten oder ungenannten Hilfsmittel verwendet. Die Arbeit stellt keine Kopie anderer Arbeiten dar und die Literatur ist vollständig angegeben.

Berlin, den 25.09.04

Maike Knackstedt